

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA P
Bureau interna

3

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAIT

WO 9608564A1

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/13, C07K 16/28, 16/00, C12N 15/86		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/08564
			(43) Date de publication internationale: 21 mars 1996 (21.03.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01167		(74) Mandataires: ORES, Irène etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).	
(22) Date de dépôt international: 12 septembre 1995 (12.09.95)		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 94/10858 12 septembre 1994 (12.09.94) FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). PROTEINE PERFORMANCE S.A. [FR/FR]; Route d'Alès, F-30380 Saint-Christol-lès-Alès (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MARGARITTE, Christelle [FR/FR]; Résidence Colbert, Bâtiment E, 16, rue du Général-de-Gaulle, F-92290 Châtenay-Malabry (FR). POUL, Marie-Alix [FR/FR]; 10, rue du Dr. Roux, F-34000 Montpellier (FR). LEFRANC, Marie-Paule [FR/FR]; 4, rue du Vallon, F-34830 Clapiers (FR). CERVONI MARY, Florence [FR/FR]; 15, avenue Antonia-Augusta, F-06000 Nice (FR). BERNARD, Alain [FR/FR]; 2307, chemin de l'Escours, F-06480 La Colle-sur-Loup (FR).			
(54) Title: HUMANISED ANTIBODY TO INTEGRIN CHAIN BETA-1			
(54) Titre: ANTICORPS HUMANISE DIRIGE CONTRE LA CHAINE BETA 1 DES INTEGRINES			
(57) Abstract			
<p>Variable domains of a non-human immunoglobulin are humanised by selecting DNA sequences coding for the variable domains of a human immunoglobulin wherein the amino acid sequence of the framework regions of variable domains V_H and V_L is 70-95 % homologous with the amino acid sequence of the framework regions of variable domains V_H and V_L of non-human immunoglobulin, and wherein hypervariable loops H1 and H2 or L1, L2 and L3 have the same kind of canonical structure as hypervariable loops H1 and H2 or L1, L2 and L3, respectively, of non-human immunoglobulin, and by replacing the oligonucleotide sequences coding for the CDRs of human immunoglobulin with oligonucleotide sequences coding for the corresponding CDRs of non-human immunoglobulin. The cloning, in a baculovirus, of DNA fragments that code for said humanised variable domains, and the expression of the resulting humanised recombinant antibody, are also disclosed. Murine monoclonal antibody K20 has thus been humanised and expressed according to the invention.</p>			
(57) Abrégé			
<p>L'invention est relative à l'humanisation des domaines variables d'une immunoglobuline non-humaine, par sélection de séquences d'ADN codant pour les domaines variables d'une immunoglobuline humaine dont la séquence en acides aminés des régions de charpente des domaines variables V_H et V_L présente entre 70 et 95 % d'homologie avec la séquence en acides aminés des régions de charpente des domaines variables V_H et V_L de l'immunoglobuline non-humaine, et dont les boucles hypervariables H1 et H2 ou L1, L2 et L3 présentent respectivement le même type de structure canonique que les boucles hypervariables H1 et H2 ou L1, L2 et L3 de l'immunoglobuline non-humaine, et remplacement des séquences oligonucléotidiques codant pour les CDR de l'immunoglobuline humaine, par les séquences oligonucléotidiques codant pour les CDR correspondantes de l'immunoglobuline non-humaine. L'invention est également relative au clonage dans un baculovirus, de fragments d'ADN qui codent pour lesdits domaines variables humanisés, et à l'expression d'un anticorps recombinant humanisé obtenu de la sorte. L'anticorps monoclonal murin K20 a été ainsi humanisé et exprimé conformément à l'invention.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ANTICORPS HUMANISE DIRIGE CONTRE LA CHAÎNE BETA 1 DES INTEGRINES

La présente Invention est relative à l'obtention en cellules d'insecte, d'un anticorps monoclonal recombinant humanisé.

L'anticorps monoclonal K20 est un anticorps murin qui reconnaît la sous-unité $\beta 1$ (CD29) des intégrines. Des expérimentations *in vitro* ont montré que K20 pouvait inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T périphériques induite par un anticorps anti-CD3 [GROUX et al., Nature, 339, 152-154 (1989) ; TICCHIONI et al., J.Immunol., 151, 119-127 (1993)]. Il pourrait donc être envisagé d'utiliser cet anticorps dans le cadre d'une thérapeutique immunosuppressive.

Cependant, l'utilisation d'anticorps murins en thérapeutique humaine est très limitée, car les injections répétées d'anticorps non-humains induisent chez les patients une réponse immune qui empêche un traitement au long cours.

Afin d'éviter cet inconvénient il a été proposé de fabriquer par génie génétique des anticorps recombinants, dans lesquelles la plus grande partie possible de la molécule est dérivée d'un gène d'origine humaine.

Il a ainsi été obtenu des anticorps dits chimériques, dans lesquels seuls les parties variables sont d'origine non-humaine.

Pour réduire encore les risques de réponse immune, on cherche actuellement de plus en plus à obtenir des anticorps dits humanisés, dont les séquences des parties variables non directement impliquées dans la reconnaissance de l'antigène sont remplacées par des séquences d'origine humaine.

L'humanisation d'un anticorps non-humain implique donc de déterminer avec le plus de précision

possible quels sont les résidus d'acides aminés de l'anticorps non-humain qui sont impliqués dans la reconnaissance de l'antigène (et qui doivent être conservés dans l'anticorps humanisé), et quels sont ceux
5 qui au contraire, peuvent être remplacés pour reproduire les séquences d'un anticorps humain, sans affecter ou en affectant le moins possible, la reconnaissance de l'antigène.

La reconnaissance de l'antigène implique en particulier les régions des parties variables dénommées CDR (régions déterminant la complémentarité), mais il a également été constaté que le positionnement de certains résidus d'acides aminés des régions de charpente (régions FR) pouvaient également influencer la conformation du
15 site antigénique.

La présente Invention a pour but l'humanisation de l'anticorps murin K20, et l'expression de l'anticorps humanisé ainsi obtenu dans un système vecteur/hôte approprié.

20 Pour humaniser l'anticorps K20, la séquence en acides aminés des régions variables V_H et V_L de cet anticorps a tout d'abord été déterminée, ce qui permet de localiser les CDR. Classiquement, en effet, l'humanisation d'un anticorps s'effectue en greffant ses
25 CDR à la place des CDR d'un anticorps humain.

Les Inventeurs ont eu l'idée de déterminer en outre, à partir de la séquence des régions variables de K20, le type de structure canonique des boucles hypervariables L1, L2, L3, H1 et H2.

30 Les structures canoniques, qui ont été observées pour la plupart des boucles hypervariables (à l'exception de la boucle H3), et qui sont conservées entre différentes espèces, sont déterminées par un petit nombre de résidus clés des régions FR et des CDR :
35 différents types de structures canoniques ont été définis, selon la taille de la boucle, et la nature des

résidus acides aminés qu'elle comprend [CHOTIA et LESK, J. Mol. Biol., 196(4), p 901, (1987) ; CHOTIA et al., Nature, 342, p 877, (1989) ; CHOTIA et al., J. Mol. Biol., 227(3), p799, (1992)].

5 Les Inventeurs ont ensuite sélectionné des régions V_H et V_L humaines dont la séquence en acides aminés présente une forte homologie (de préférence entre 74 et 95 % d'homologie) avec la séquence des régions V_H et V_L de l'anticorps murin K20, et dont les boucles hypervariables L1, L2, L3, H1 et H2 présentent le même type de structure canonique que les boucles hypervariables correspondantes dudit anticorps murin.

10 Dans les régions V_H et V_L humaines ainsi sélectionnées, les Inventeurs ont alors procédé au remplacement des CDR par les CDR correspondantes de l'anticorps murin K20, afin d'obtenir les régions V_H et V_L de l'anticorps humanisé.

15 Le procédé décrit ci-dessus peut être généralisé à l'humanisation des régions variables de tout anticorps monoclonal d'origine non-humaine, en particulier d'origine murine.

20 La présente Invention a pour objet un procédé d'humanisation de la région variable V_H et/ou de la région variable V_L d'une immunoglobuline non-humaine, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

25 - une étape où l'on sélectionne une séquence d'ADN codant pour la région variable V_H ou pour la région variable V_L d'une immunoglobuline humaine, la séquence en acides aminés des régions FR de ladite région V_H ou de ladite région V_L humaine présentant respectivement entre 70 et 95 % d'homologie avec la séquence en acides aminés des régions FR de la région V_H ou de la région V_L de l'immunoglobuline non-humaine, et les boucles hypervariables H1 et H2 de ladite région V_H humaine ou les boucles hypervariables L1, L2 et L3 de ladite région

V_L humaine présentant respectivement le même type de structure canonique que les boucles hypervariables H1 et H2 de la région V_H ou les boucles hypervariables L1, L2 et L3 de la région V_L de l'immunoglobuline non-humaine

5 - une étape où l'on procède au remplacement des séquences oligonucléotidiques codant pour les CDR de ladite région V_H ou V_L humaine, par les séquences oligonucléotidiques codant pour les CDR correspondantes de la région V_H ou V_L de l'immunoglobuline non-humaine. A
10 l'issue de cette étape, on obtient une séquence codant pour la région V_H ou V_L de l'immunoglobuline humanisée.

Le procédé conforme à l'Invention peut être complété par la mutation ponctuelle (remplacement, addition ou délétion d'un codon) d'une ou plusieurs
15 séquences oligonucléotidiques codant pour un ou plusieurs acides aminés situés dans les FR de la région V_H ou V_L.

Une telle mutation peut par exemple être effectuée dans le cas où la séquence en acides aminés de la région V_H ou de la région V_L humaine qui a été
20 sélectionnée pour son homologie avec la région V_H ou V_L non-humaine, présente, à une position déterminée, un acide aminé "inhabituel" pour le sous-groupe de variabilité auquel elle appartient. Il peut être alors opportun de remplacer cet acide aminé par un acide aminé
25 plus représentatif. De manière générale, on cherchera à se rapprocher autant que possible des séquences consensus des FRs du sous-groupe humain le plus homologue, afin de réduire encore l'immunogénicité de l'anticorps humanisé.

Il peut également être indiqué de procéder à
30 une telle mutation lorsque l'on souhaite augmenter l'affinité de l'anticorps humanisé pour l'antigène ; on cherchera dans ce cas là à se rapprocher de la structure canonique des boucles hypervariables de l'immunoglobuline non-humaine parentale.

35 La présente Invention a également pour objet un fragment d'ADN, codant pour la région variable V_H ou

pour la région variable V_L d'un anticorps humanisé, et caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé conforme à l'invention, tel que défini ci-dessus.

5 Un fragment d'ADN codant pour la région variable V_H ou pour la région variable V_L d'un anticorps humanisé conformément à l'invention peut ensuite être fusionné avec un fragment d'ADN codant pour la région constante d'une chaîne H ou L humaine, en vue d'exprimer
10 les chaînes H et L complètes obtenues de la sorte.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente Invention, ledit anticorps humanisé est obtenu à partir de l'anticorps murin K20. Dans ce qui suit, on désignera un anticorps humanisé obtenu par le procédé
15 conforme à l'Invention par l'abréviation Hu-Ac, et plus particulièrement, l'anticorps humanisé dérivé de l'anticorps K20, par l'abréviation Hu-K20.

La présente Invention a pour objet un fragment d'ADN, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe
20 constitué par :

- une séquence codant pour le domaine variable de la chaîne légère de l'anticorps Hu-Ac, fusionnée à une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère d'une immunoglobuline humaine ; ou

- 25 - une séquence codant pour le domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps Hu-Ac, fusionnée à une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne lourde d'une immunoglobuline humaine.

Pour exprimer un anticorps humanisé conforme à l'Invention, on utilisera de préférence un système
30 d'expression qui a également été mis au point par les Inventeurs, qui utilise un vecteur d'expression dérivé d'un baculovirus, et permet de produire à la fois la chaîne lourde (H) et la chaîne légère (L) d'un anticorps
35 donné dans une cellule d'insecte.

La présente Invention a également pour objet une cassette d'expression comprenant une séquence d'ADN recombinant constituée par une séquence codant pour la région variable de la chaîne légère de l'anticorps Hu-Ac fusionnée à une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère d'une immunoglobuline humaine ; ou par une séquence codant pour la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps Hu-Ac fusionnée à une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère d'une immunoglobuline humaine, laquelle séquence d'ADN recombinant est placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente Invention, ledit promoteur est un promoteur de baculovirus.

A titre d'exemple de promoteurs de baculovirus utilisables pour la mise en oeuvre de la présente Invention, on citera les promoteurs de la polyédrine et de P10 des baculovirus AcMNPV ou SLMNPV, ou des dérivés de promoteurs de baculovirus, constitués par des promoteurs synthétiques ou recombinants, obtenus à partir d'un promoteur de baculovirus, et fonctionnels en cellules d'insectes, tel que par exemple celui décrit par WANG et al, [Gene, 100, 131-137, (1991)].

Une cassette d'expression conforme à ce mode de réalisation comprend par exemple:

- un promoteur de baculovirus, tel que défini ci-dessus ;
- une séquence codant pour un peptide signal de sécrétion ;
- une séquence d'ADN codant pour la chaîne H ou la chaîne L d'un anticorps HU-Ac, tel que défini ci-dessus.

Un grand nombre de séquences codant pour des peptides signal fonctionnels en cellules d'insecte sont utilisables pour la mise en oeuvre de la présente

Invention. A titre d'exemple non limitatif, on citera les séquences codant pour les peptides signal de l'acétylcholinestérase de Drosophile, de la trophoblastine ovine, ainsi que les séquences codant pour les peptides signal des chaînes H et L d'immunoglobulines murines ou humaines, etc...

Chacune des cassettes conformes à l'invention permet l'expression, soit de la chaîne légère, soit de la chaîne lourde, d'un anticorps Hu-Ac, possédant la spécificité de l'anticorps monoclonal parental.

On peut choisir la séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère parmi les séquences codant pour les domaines constants des chaînes légères kappa (κ) et lambda (λ).

On peut choisir la séquence codant pour le domaine constant de la chaîne lourde parmi les séquences codant pour les domaines constants des chaînes lourdes $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, α , ϵ , et μ . On peut ainsi obtenir un anticorps recombinant appartenant à la classe d'immunoglobuline (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM) que l'on souhaite.

La présente Invention a également pour objet des vecteurs recombinants, portant au moins une cassette d'expression telle que définie ci-dessus ; dans ce cadre, la présente Invention englobe en particulier des baculovirus recombinants permettant l'expression de l'anticorps Hu-Ac, ainsi que des plasmides de transfert permettant la construction desdits baculovirus recombinants.

Les plasmides de transfert conformes à l'invention portent un insert comprenant : une cassette d'expression telle que définie ci-dessus, et de part et d'autre de cette cassette, des séquences de baculovirus homologues de celles des régions flanquant la portion du génome viral en remplacement de laquelle on souhaite insérer ladite cassette.

Selon un mode de réalisation préféré des plasmides de transfert conformes à la présente Invention, lesdites séquences de baculovirus sont homologues de celles des régions flanquant le gène de la p10, ou homologues de celles des régions flanquant le gène de la polyédrine.

Selon une disposition particulièrement avantageuse de ce mode de réalisation, la cassette d'expression contenant le gène codant pour la chaîne légère de l'anticorps Hu-Ac est flanquée des régions entourant le gène de la polyédrine dans le baculovirus sauvage, et la cassette d'expression portant le gène codant pour la chaîne lourde de l'anticorps Hu-Ac est flanquée des régions entourant le gène P10 dans le baculovirus sauvage.

Schématiquement, la construction des plasmides de transfert conformes à l'invention se fait en insérant dans un plasmide capable de se répliquer chez un hôte bactérien (en général *E. coli*), la région du gène de baculovirus (par exemple p10 ou polyédrine, ou tout autre locus du baculovirus) à la place duquel on souhaite insérer les gènes codant pour les chaînes H ou L d'immunoglobuline. Dans cette région, la séquence codante du gène de baculovirus (et éventuellement la séquence promoteur dudit gène) est remplacée par la séquence codant pour la chaîne d'immunoglobuline à exprimer (et éventuellement par la séquence du promoteur sous contrôle duquel on souhaite exprimer cette chaîne d'immunoglobuline, s'il s'agit par exemple d'un promoteur "dérivé"). Le plasmide de transfert ainsi obtenu contient donc un insert comprenant une séquence hétérologue (séquence d'une chaîne de l'anticorps Hu-Ac) flanquée de séquences de baculovirus.

Pour permettre l'expression simultanée de la chaîne lourde (chaîne H) et de la chaîne légère (chaîne L) et leur réassociation pour former la molécule

d'anticorps recombinant, les Inventeurs ont inséré les deux cassettes sur un même vecteur d'expression. Ils ont ainsi obtenu un baculovirus double recombinant dans lequel la séquence codante de chacune des chaînes H et L est sous le contrôle d'un promoteur fort.

Un baculovirus recombinant conforme à l'Invention, permettant l'expression de l'anticorps Hu-Ac, peut être construit selon le principe suivant :

- l'on prépare séparément deux plasmides de transfert, tels que définis ci-dessus : un pour la chaîne H, et un pour la chaîne L.

On cotransfecte ensuite les cellules d'insecte avec l'ADN des vecteurs de transfert ainsi réalisés et l'ADN du baculovirus. Cette cotransfection est effectuée en deux étapes :

Le plasmide de transfert contenant la cassette d'expression pour le gène de la chaîne légère flanquée des régions entourant le gène de la polyédrine dans le baculovirus sauvage, est utilisé, avec l'ADN de baculovirus sauvage AcMNPV, pour cotransfecter des cellules d'insecte en culture.

Par recombinaison homologue entre l'ADN viral et le plasmide, les séquences codantes de la chaîne légère de l'immunoglobuline recombinante sont transférées dans le génome viral.

Après répllication de l'ADN viral dans les cellules transfectées, l'on procède à la sélection des baculovirus recombinants ayant intégré la séquence de la chaîne légère de l'immunoglobuline recombinante.

Ces baculovirus recombinants sont sélectionnés selon deux critères : leur incapacité à produire des polyèdres et leur capacité à exprimer la chaîne légère.

Dans une deuxième étape, les cellules sont cotransfectées avec l'ADN du baculovirus recombinant obtenu à l'issue de la première étape, et avec celui du plasmide de transfert contenant la cassette d'expression

portant le gène codant pour la chaîne lourde de l'anticorps recombinant Hu-Ac flanquée des régions entourant le gène P10 du baculovirus. Par recombinaison homologue, comme précédemment, le gène de la chaîne lourde est transféré dans l'ADN viral.

L'on sélectionne alors les virus double-recombinants qui sont capables de produire simultanément une chaîne lourde et une chaîne légère d'immunoglobuline. La détection de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'immunoglobuline est effectuée par ELISA.

La présente Invention a pour objet un baculovirus recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cassette d'expression, telle que définie ci-dessus, comprenant une séquence codant tout ou partie de la chaîne H ou une séquence codant pour tout ou partie de la chaîne L de l'anticorps Hu-Ac, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur fort de baculovirus.

Selon un mode de réalisation d'un baculovirus recombinant conforme à l'invention il comprend une cassette d'expression comprenant la séquence codant pour la chaîne H et une cassette d'expression comprenant la séquence codant pour la chaîne L, de l'anticorps Hu-Ac.

Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne L de l'anticorps Hu-Ac, et le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne H de l'anticorps Hu-Ac, sont deux promoteurs différents.

Selon une modalité avantageuse de cette disposition, l'un desdits promoteurs est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la polyédrine et l'autre est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la P10.

Selon encore une autre modalité avantageuse de cette disposition, l'un des promoteurs est le promoteur de la polyédrine ou l'un de ses dérivés, et l'autre est le promoteur de la p10 ou l'un de ses dérivés.

5 Avantageusement, le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne légère de l'anticorps Hu-Ac est le promoteur de la polyédrine ou l'un de ses dérivés, et le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne lourde
10 de l'anticorps Hu-Ac est le promoteur de la P10 ou l'un de ses dérivés.

 Selon une autre disposition de ce mode de réalisation, la séquence codant pour le peptide signal associé à la chaîne L de l'anticorps Hu-Ac, et la
15 séquence codant pour le peptide signal associé à la chaîne H de l'anticorps Hu-Ac, sont deux séquences différentes.

 Un baculovirus recombinant conforme à l'Invention, a été déposé le 9 septembre 1994, auprès de
20 la C.N.C.M. (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes, tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur ROUX, Paris), sous le numéro I-1476.

 La présente Invention englobe également des cellules d'insecte infectées avec un baculovirus
25 recombinant conforme à l'invention.

 L'expression et la production de l'anticorps monoclonal recombinant Hu-Ac est obtenue *in vitro* dans des cellules d'insecte conformes à l'invention.

 L'infection des cellules par un baculovirus
30 double recombinant conforme à l'Invention résulte dans la production simultanée des chaînes H et L. Ces chaînes s'assemblent pour reconstituer l'anticorps Hu-Ac qui est par la suite sécrété dans le milieu de culture.

 La présente Invention a également pour objet
35 un procédé de préparation d'un anticorps recombinant humanisé, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au

cours de laquelle l'on cultive des cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant conforme à l'invention, et une étape au cours de laquelle l'on obtient ledit anticorps à partir du milieu de culture.

5 Un anticorps recombinant humanisé conforme à l'Invention peut être utilisé pour le diagnostic, ou pour la thérapeutique. Une utilisation particulièrement intéressante, dans le cas de l'anticorps humanisé K20 concerne l'obtention de médicaments immunosuppresseurs.

10 La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention, conformément à l'Invention, de l'anticorps recombinant humanisé Hu-K20, conforme dans un baculovirus recombinant.

15 Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1. : Clonage et séquençage des parties variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère de l'anticorps K20.

20 Le MAb K20 est un anticorps murin produit par un hybridome. Il est dirigé contre la sous-unité β des récepteurs CD29 des lymphocytes [BOUMSELL et al., J. Exp. Med. 152, p. 229 (1980)].

25 L'ARN total de l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal K20 a été extrait à l'aide du kit "RNA extraction Kit" de PHARMACIA. L'ADNc est synthétisé à partir de 10 μ g d'ARN par transcription inverse (First-Strand cDNA Synthesis kit ; PHARMACIA).

30 Les parties variables des chaînes lourdes (V_H) et légères (V_L) sont amplifiées par ACP (amplification en chaîne par polymérase) à partir de 1 μ g d'ADNc simple brin, en utilisant la Taq DNA polymérase.

35 Les produits d'amplification sont purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% pour les séparer

des oligonucléotides ; la bande correspondant au produit recherché est excisée du gel, et l'ADN est élué par centrifugation (microcentrifugeuse SPIN-X, COSTAR, Cambridge, MA), puis extrait au phénol/chloroforme et précipité à l'éthanol,

1. Clonage de la région variable de la chaîne légère κ de K20 :

La transcription inverse a été réalisée en utilisant l'amorce VK1FOR :

*VK1FOR (SEQ ID NO : 1) :

5'- GGT AGA TCT CAG CTT GGT CCC 3'

Cette amorce est complémentaire de la séquence consensus à l'extrémité 3' de la région variable Vk des gènes murins, et comporte un site BglII (souligné).

L'ADNc obtenu a été amplifié par ACP en utilisant d'une part l'amorce VK1FOR ci-dessus, et d'autre part l'amorce VK1BAC :

*VK1BAC (SEQ ID NO : 2) :

5'- GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA -3'

(site PvuII souligné).

Ces amorces ont été décrites par ORLANDI et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, p 3833, (1989)].

Le produit d'amplification a été récupéré par électrophorèse sur gel d'agarose, extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol, puis digéré par PvuII et BglII, et le fragment obtenu a été cloné dans le phage M13VKPCR1 (ORLANDI et al., publication précitée), préalablement digéré par PvuII et BclI, pour donner le phage M13VKK20PCR1 (figure 1A).

2- Clonage de la région variable de la chaîne lourde γ 1 de K20 :

La transcription inverse sur l'ARN total extrait de l'hybridome producteur de K20 a été réalisée en utilisant l'amorce VH1FOR. Cette même amorce, et l'amorce VH1BAC ont par la suite servi à amplifier la région V_H à partir de l'ADNc :

*VH1FOR (SEQ ID NO : 3) :

5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA G-3'

(Site BstEII souligné).

*VH1BAC (SEQ ID NO : 4) :

5'-AG GT(C/G) (A/C)A(A/G) CTG CAG (C/G) AG TC(A/T) GG-3'

(Site PstI souligné).

Ces amorces ont été décrites par ORLANDI et al. (publication précitée).

Le produit d'amplification a été purifié comme décrit ci-dessus, puis digéré par BstEII et PstI, et le fragment obtenu a été cloné dans le phage M13VHPCR1 (ORLANDI et al., publication précitée), préalablement digéré par BstEII et PstI, pour donner le phage M13VHK20PCR1.

La figure 1A représente les étapes du clonage des séquences V_K et V_H de K20. Les phages M13VKK20PCR1 et M13VHK20PCR1 comprennent, outre les séquences de K20, un promoteur (P) de chaîne H d'Ig, et la séquence de tête (L) du gène V_H V47 de souris.

La séquence nucléotidique des inserts K20 des phages M13VKK20PCR1 et M13VHK20PCR1 a été déterminée.

La séquence de l'insert codant pour la région variable V_K de la chaîne légère de l'anticorps K20 est représentée à la figure 2 A, et identifiée sur la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 5.

La séquence de l'insert codant pour la région variable V_H de la chaîne lourde de l'anticorps K20 est représentée à la figure 2 B, et identifiée sur la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 6.

Les emplacements des CDR, ainsi que ceux des amorces qui ont été utilisées, et ceux des sites de restriction ayant permis le clonage sont indiqués sur ces figures 2A et 2B.

Exemple 2. : Humanisation des parties variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère de l'anticorps K20.

La figure 1B représente les étapes de l'humanisation des régions variables V_K et V_H de K20.

5 1. Humanisation de la région variable de la chaîne légère κ de K20 :

M13VKPCR1 contient un gène V_K de souris, qui comprend les régions charpente (FRs) de la protéine κ de myélome humain REI, et les régions déterminant la compléментарité (CDRs) de l'anticorps monoclonal de souris D1.3 [VERHOEYEN et al., Science, 239, p 1534 (1988)].

10 Les régions charpente de ce gène V_K ont été utilisées pour humaniser le gène V_K de K20.

15 3 oligonucléotides, VKMUTCDR1, VKMUTCDR2, et VKMUTCDR3, correspondant respectivement aux CDRs 1, 2, et 3 de la chaîne V_K de K20 ont été construits, afin de remplacer les CDRs V_K de D1.3. Ces 3 oligonucléotides comprennent également 12 nucléotides supplémentaires à l'extrémité 5' et au moins 12 nucléotides supplémentaires à l'extrémité 3', incluant un C ou un G terminal, et complémentaires du voisinage immédiat du CDR à remplacer.

20 La mutagenèse a été effectuée selon le protocole préconisé par KUNDLE [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, p 488 (1985)]

25 Le phage résultant du remplacement dans M13VKPCR1, des CDRs V_K de D1.3 par les CDRs de V_K de K20, est dénommé M13HuVKK20PCR1

30 2. Humanisation de la région variable de la chaîne lourde de K20 :

Les régions charpente du gène V_H humain F1 (numéro d'accès EMBL X17675) ont été utilisées pour humaniser le gène V_H de K20.

Le gène V_H F1 a été amplifié par ACP à partir du vecteur M13mp18VHF1RF. [MILILI et al., Mol. Immunol., 28, p 753 (1991)], en utilisant les amorces VH1BAK et VH1FOR décrites ci-dessus.

5 Le produit d'amplification a été purifié comme décrit ci-dessus, puis digéré par BstEII et PstI, et le fragment obtenu a été cloné dans le phage M13VHPCR1.

3 oligonucléotides, VHMUTCDR1, VHMUTCDR2, et VHMUTCDR3, correspondant respectivement aux CDRs 1, 2, et
10 3 de la chaîne V_H de K20 ont été construits, afin de remplacer les CDRs V_H de F1 par ceux de K20.

La mutagenèse a été effectuée comme décrit ci-dessus, et le phage résultant est dénommé M13HuVHK20PCR1.

Les séquences complémentaires inverses de
15 celles des oligonucléotides VKMUTCDR1, VKMUTCDR2, VKMUTCDR3, VHMUTCDR1, VHMUTCDR2, et VHMUTCDR3, utilisés pour l'humanisation des régions variables des chaînes lourdes et légères sont représentées à la figure 3, et sont également identifiées dans la liste des séquences en
20 annexe sous les numéros respectifs SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 10, SEQ ID NO : 11, et SEQ ID NO : 12.

Dans la figure 3, les nucléotides correspondant aux CDRs des gènes humanisés sont
25 soulignés ; les nucléotides existant initialement dans le gène VKREI/D1.3 et dans le gène VHF1 sont en lettres capitales ; les nucléotides changés par mutagenèse sont en lettres minuscules ; les emplacements des nucléotides délétés par mutagenèse des gènes initiaux sont
30 représentés par des tirets.

Exemple 3 : Construction de plasmides de transfert portant les séquences variables humanisées de K20

A) PLASMIDE DE TRANSFERT POUR LA CHAÎNE LÉGÈRE

KAPPA :

1) Obtention du plasmide pBCk

a- Plasmide pGmAc116T :

Ce vecteur est dérivé du plasmide pGmAc115T [ROYER et al., J. Virol., 66, 3230-3235, (1992)], lui-même dérivé du plasmide pAc1 [CHAABIHI et al., J. Virol., 67, 2664-2671 (1993)] contenant le fragment EcoRI-I du baculovirus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* (AcMNPV), et donc le gène polyédrine, et les séquences flanquant ledit gène. Pour obtenir pGmAc116T, le plasmide pGmAc115T a été délété d'un fragment de 1900pb allant d'un site EcoRI situé en amont du gène polyédrine à un site XhoI situé 1900pb en aval de ce site EcoRI.

5 µg du plasmide pGmAc115T ont été digérés pendant 2 heures à 37°C par 15 unités d'enzyme XhoI (BOEHRINGER), dans un volume réactionnel de 50 µl et dans les conditions préconisées par le fournisseur. Après extraction au phénol/chloroforme, l'ADN plasmidique a été précipité à l'alcool. Cet ADN a été ensuite partiellement coupé par EcoRI (BOEHRINGER) dans un volume réactionnel de 50 µl en présence de 0,5 unité d'enzyme. L'incubation a été faite à 37°C pendant 20 minutes. Après une nouvelle extraction au phénol/chloroforme, les extrémités générées par les coupures XhoI et EcoRI ont été rendues franches par l'enzyme de Klenow (BIOLABS) en présence des 4 dNTPs, selon le protocole préconisé par le fournisseur. L'ADN plasmidique a enfin été précipité à l'alcool et incubé avec la ligase du phage T4 (BOEHRINGER) dans les conditions préconisées par le fournisseur.

Des bactéries *E. coli* compétentes ont été transformées par une partie du mélange de ligation ; le criblage des colonies issues de cette transformation a

permis de sélectionner le plasmide pGmAc116T. Ce plasmide contient un site BglII en aval du promoteur de la polyédrine.

b- Peptide signal :

5 La séquence codante de ce peptide est celle du peptide signal d'un gène V_H de souris [NEUBERGER M.S., EMBO J., 2, 1373-1378, (1983)].

10 Cette séquence a été synthétisée chimiquement sous forme de deux oligonucléotides complémentaires ayant des extrémités permettant l'insertion du duplex dans un site BglII. Pour l'appariement, 15 µg de chacun des deux oligonucléotides sont incubés dans 50 µl de tampon (Tris 1 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM), pendant 5 minutes dans un bain marie à 70°C. Le bain est ensuite laissé refroidir
15 jusqu'à température ambiante (22 à 25°C). Le produit d'appariement est utilisé directement dans les réactions de ligation avec le plasmide pGmAc116T préalablement coupé par BglII.

20 Les conditions de ligation sont les suivantes :

1 µg du plasmide pGmAc116T coupé par BglII ;
1 µg de l'oligonucléotide bicaténaire portant la séquence codant pour le peptide signal ; 2 µl de tampon ligase 10X (BOEHRINGER) ; eau distillée q.s.p. 19 µl ; 1 unité (1 µl)
25 de ligase (BOEHRINGER). L'incubation est effectuée à 22°C pendant 2 heures ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes.

c- Région constante Ck :

30 La séquence codante de la région constante de la chaîne légère κ humaine a été amplifiée par ACP en utilisant comme matrice de l'ADNc de lymphocytes B humains. Les lymphocytes humains (environ 5×10^8) ont été préparés à partir de 200 ml de sang en utilisant HISTOPAQUE® (SIGMA). L'ARN total a été extrait de ces
35 lymphocytes en utilisant un kit PHARMACIA (RNA extraction kit). Le premier brin d'ADNc a été préparé à partir de

l'ARN total à l'aide du kit "First-Strand cDNA synthesis kit" de PHARMACIA.

Les amorces utilisées pour amplifier le cDNA Ck sont les suivantes :

5 * HuCkBAC (SEQ ID NO : 13) :

5'-AG CTC GAG ATC AAA CGG-3'

(le site XhoI est souligné).

10 Cette amorce correspond à une séquence consensus en 3' des séquences codant pour les domaines variables des chaînes légères d'immunoglobulines de souris (Jk), et contient un site de coupure par XhoI.

* HuCkFOR (SEQ ID NO : 14) :

5'-GAA GAT CTA ACA CTC TCC GCG GTT GAA G-3'

(le site BglII est souligné).

15 Cette amorce est complémentaire de l'extrémité 3' des gènes Ck humains et apporte un site BglII en aval du codon stop TAG.

20 L'amplification avec les amorces HuCkBAC et HuCkFOR a permis d'obtenir un fragment d'environ 340 pb contenant la totalité de la région Ck encadrée des sites XhoI et BglII.

25 Le produit de l'amplification a été digéré par BglII et XhoI avant d'être cloné dans les sites XhoI-BglII du plasmide pGmAc portant la séquence codant pour le peptide signal.

La composition du mélange de ligation est la suivante :

30 1µg du plasmide pGmAc coupé par XhoI et BglII ; 200 ng du fragment Ck amplifié et digéré par BglII et XhoI, 2µl de tampon ligase 10X (BOEHRINGER), eau distillée q.s.p. 19µl, 1 unité (1µl) de ligase (BOEHRINGER).

35 L'incubation est effectuée à 22°C pendant 2 heures ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes.

Le plasmide obtenu est dénommé pBCk.

2) Clonage de la région variable humanisée de la chaîne κ de K20

Le clonage de la région variable humanisée de la chaîne légère κ de K20 a été réalisé de la manière suivante :

La région V_K humanisée de K20 a été amplifiée par ACP en utilisant :

- comme matrice, l'ADN du phage M13HuVKK20PCR1 décrit à l'exemple 2 ci-dessus ;

- une amorce OPP-SovK(3'), dont la séquence est la suivante:

* OPP-SovK(3') (SEQ ID NO : 15) :

5' -ACG TTT CTC GAG CYT GGT SCC - 3'

(site XhoI souligné)

Y représente C ou T, et S représente C ou G

- une amorce VKK20Hu(5'), dont la séquence est la suivante:

* VKK20Hu(5') (SEQ ID NO : 16) :

5' - GAC ATC GAG CTC ACC CAG- 3'

(site SacI souligné)

Ces amorces apportent respectivement les sites de restriction XhoI et SacI.

L'amplification a été réalisée en 30 cycles successifs d'incubation à 95°C pendant 30 secondes, 40°C pendant 30 secondes, et 72°C pendant 30 secondes, puis a été suivie d'une incubation à 72°C pendant 10 minutes.

Après amplification de la région V_K , une digestion par les enzymes SacI et XhoI du produit d'amplification a été réalisée et le fragment obtenu a été inséré entre les sites SacI et XhoI du plasmide pBLUESCRIPT IIS ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes. Quelques clones sont sélectionnés, et séquencés pour vérification.

L'ADN plasmidique du clone sélectionné est préparé, digéré par SacI et XhoI, et le fragment SacI-XhoI de 303 pb est purifié.

Le fragment SacI-XhoI est introduit dans pBCK. La composition du mélange de ligation est la suivante :

2 µl de tampon 10X pour la T4-DNA ligase (BOEHRINGER) ; 100 ng du fragment SacI-XhoI, 1 µl du plasmide pBCK coupé par SacI et XhoI ; 1 µl de ligase (1 unité), et eau distillée q.s.p. 20 µl.

L'incubation est effectuée à 16°C pendant 8 heures puis le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* compétentes.

On sélectionne un clone contenant le plasmide pBCK-VkK20hu, qui sera utilisé comme vecteur de transfert.

B) PLASMIDE DE TRANSFERT POUR LA CHAÎNE LOURDE

1) Obtention du plasmide pBCy1

a- Plasmide de transfert :

Le plasmide pGm16 [BLANC et al, Virology, 192, 651-654, (1993)] dérive d'un plasmide dans lequel a été cloné le fragment EcoRI-P du baculovirus AcMNPV contenant le gène p10. La quasi-totalité de la séquence codante a été délétée et remplacée par un site BglII permettant l'insertion de séquences à exprimer sous le contrôle du promoteur p10.

b- Peptide signal :

La séquence codante de ce peptide est celle d'un gène *V_H* de souris (NEUBERGER M.S., 1983. EMBO J, 2, 1373-1378).

Elle a été synthétisée chimiquement sous forme de brins complémentaires, de manière à ce qu'elle puisse être insérée dans un site BglII. Les conditions d'appariement et de ligation sont identiques à celles utilisées pour la chaîne légère.

c- Régions constantes humaines (Cyl):

Le cDNA de la séquence codante de la région Cyl humaine a été amplifié par ACP en utilisant les amorces suivantes :

5 *HuCylBAC (SEQ ID NO : 17) :

5' CAA GGT ACC ACG GTC ACC GTC TCC - 3'
(site KpnI souligné).

Cette amorce comprend un site KpnI.

*HuCylFOR (SEQ ID NO : 18):

10 5'-GAAGATC TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA G-3'
(site BglII souligné).

L'amorce permet de reconstituer après amplification un site BglII en aval du codon stop.

La matrice utilisée pour amplifier la région
15 Cyl humaine est le même mélange d'ADNc que celui utilisé pour l'amplification des séquences Ck

Le produit d'amplification a été séquencé et cloné dans le vecteur de transfert pGm16 portant la séquence codant pour le peptide signal. La construction
20 obtenue a été appelée pBCyl.

2) Clonage de la région variable humanisée de la chaîne lourde de K20

Le clonage de la région V_H humanisée de la chaîne lourde de K20 a été réalisé de la manière
25 suivante :

La région variable V_H humanisée de K20 a été amplifiée par ACP en utilisant :

- comme matrice l'ADN du phage M13HuVHK20PCR1 décrit à l'exemple 2 ci-dessus ;

30 - l'amorce VH1BAC ci-dessous (SEQ ID NO : 19)

5'-AGG TSM ARC TGC AGS AGT WCG GG-3'
(Site PstI souligné)

S = C ou G ; M = A ou C ; R = A ou G ; W = A ou T

35 - l'amorce VHFOR ci-dessous (SEQ ID NO : 20):

5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT ACC TTG GCC CCA G-3'

(Sites BstEII et KpnI soulignés).

L'amorce VHFOR diffère de l'amorce VH1FOR en ce qu'un C a été remplacé par un A pour créer un site KpnI.

5 Ces amorces apportent respectivement les sites de restriction enzymatiques PstI et KpnI.

Après amplification, une digestion PstI-KpnI du fragment d'amplification obtenu a été réalisée et le fragment obtenu a été inséré entre les sites PstI et KpnI
10 du plasmide pBLUESCRIPT IKS ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes.

Quelques clones sont sélectionnés, et vérifiés par séquençage.

15 L'ADN plasmidique du clone sélectionné est préparé, digéré par PstI et KpnII, et le fragment PstI-KpnI de 327 pb est purifié.

Le fragment PstI-KpnI est introduit dans pBCy1 pour donner le plasmide chargé pBCy1-VHK20hu.

20 **Exemple 4 : Construction d'un baculovirus recombinant produisant l'anticorps K20 humanisé**

a- Insertion de la chaîne lourde :

Le plasmide chargé pBCy1-VHK20hu a été utilisé en cotransfection avec l'ADN d'un baculovirus modifié
25 appelé AcSLp10 [CHAABIHI et al., J. Virol., 67, 2664-2671 (1993)], qui est dépourvu du gène polyédrine (promoteur+séquence codante), mais porte la séquence codante de la polyédrine sous contrôle du promoteur P10, dans le locus naturel P10. Ce virus produisant des
30 polyèdres dans les cellules infectées, la recombinaison au niveau du locus P10 peut ainsi être facilement détectée. Les conditions de cotransfection sont les suivantes : 500 ng d'ADN viral sont mélangés avec 5 µg d'ADN plasmidique et 40 µl de solution DOTAP (BOEHRINGER)
35 dans 3 ml de milieu de culture sans sérum pour cellules d'insectes. Ce mélange est utilisé pour recouvrir 4 x 10⁶

cellules Sf9 (ATCC35CRL 1711) ; après 4 heures de contact, le mélange de cotransfection est remplacé par 4 ml de milieu complet et l'incubation est faite à 27°C pendant 5 jours.

5 A la suite de la cotransfection, le virus produisant la chaîne lourde de l'anticorps K20 humanisé sous le contrôle du promoteur P10 a été purifié par la technique des plages de lyse. Ce virus a été appelé bPP1-HK20hu.

10 b- Insertion de la chaîne légère :

Le plasmide chargé pBCk-VkK20hu a été utilisé en cotransfection avec l'ADN du baculovirus modifié bPP1-HK20hu.

15 Les doubles recombinants ont été sélectionnés par la technique de la dilution limite, associée à l'ELISA.

20 Après la cotransfection, on effectue une gamme de dilutions du surnageant infectieux, et chaque dilution est utilisée pour l'infection de cellules d'insectes. Trois jours après l'infection, les surnageants sont testés en ELISA pour rechercher la présence d'anticorps de type humain correctement assemblés. Les surnageants des puits les plus positifs pour les dilutions les plus importantes sont à leur tour dilués et utilisés pour infecter d'autres cultures ; après quelques cycles dilution/infection, les surnageants enrichis en baculovirus produisant l'anticorps entier sont étalés sur un tapis cellulaire, et clonés par la méthode des plages de lyse.

30 Un clone dénommé Ac10HK20hu-33LK20hu(111) a été sélectionné. Ce clone a été déposé auprès de la CNCM, le 9 septembre 1994, sous le numéro I-1476.

Exemple 5 - Production et purification de l'anticorps K20 humanisé (Hu-K20):

Le virus double recombinant Ac10HK20hu-33LK20hu(111) a été amplifié par une série de passages sur des cellules d'insecte en culture. Le stock viral a été ensuite utilisé pour infecter une culture agitée en spinner (500 ml de culture à 10^6 cellules par ml).

Après 72 heures d'infection, la culture est récoltée et centrifugée à 1000 g pour clarifier le surnageant. Ce dernier a été concentré jusqu'au 1/3 de son volume initial par centrifugation à travers une membrane ayant un seuil de coupure de 30 kDa (CENTRIPEP 30, Amicon) (1ère centrifugation : 1000g, 20°C, 30 minutes ; élimination du filtrat ; 2ème centrifugation : 1000g, 20°C, 20 minutes).

La solution a été équilibrée dans un tampon de fixation sur protéine A, par dilution dans ce tampon suivie d'une nouvelle concentration par centrifugation (tampon de dilution : Glycine 1,5M, NaCl 3M; pH 8,9). La solution équilibrée est ensuite passée dans une colonne de protéine A, elle même équilibrée dans le même tampon que la solution de Hu-K20. Après rinçage de la colonne, l'anticorps est élué par un tampon d'élution (Acétate 0,1M, NaCl 0,5M; pH3). L'élution est suivie en mesurant la DO à 280 nm. Les fractions contenant l'anticorps ont été mélangées et concentrées par centrifugation à travers une membrane ayant un seuil de coupure de 10 kDa (CENTRIPEP 10, AMICON). La solution concentrée est diluée avec du PBS puis reconcentrée de la même manière. La solution d'anticorps obtenue est conservée à +4°C dans le PBS (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4 mM KH_2PO_4).

La qualité de l'anticorps a été contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, en utilisant comme témoin une IgG1 humaine du commerce (SIGMA). Cette expérience a montré que l'anticorps

chimère non-réduit (ponts disulfure intacts) migre au même niveau que l'anticorps humain témoin.

Après traitement par le dithiotréitol (DTT), on observe l'apparition de deux bandes correspondant aux chaînes lourdes et légères, et migrant au même niveau que les chaînes de l'anticorps humain témoin également réduit au DTT.

Pour confirmer les résultats précédents, les protéines des fractions comprenant l'anticorps ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose, et les chaînes H et L ont été détectées par des anticorps spécifiques des régions Cyl et Cx humaines.

Cette expérience démontre que l'anticorps produit par les cellules d'insectes est bien constitué de chaînes H et L, et que les parties constantes de ces chaînes sont reconnues par des anticorps spécifiques.

Le virus sélectionné Ac10HK20hu-33LK20hu(111) est multiplié sur cellules d'insectes Sf9 en milieu TGV2 (2% de sérum de veau foetal). La concentration d'anticorps produit et sécrété est évaluée par ELISA ; elle est d'environ 10mg/l.

Exemple 6 - Vérification par immunofluorescence de la spécificité du Hu-K20 produit par les cellules d'insectes :

L'anticorps monoclonal parental K20 est dirigé contre la sous-unité $\beta 1$ des intégrines humaines (récepteur CD29) localisée à la surface des lymphocytes. La fixation de K20 sur la molécule CD29 inhibe la prolifération des lymphocytes T4 humains activés [GROUX et al., Nature, 339, 152-154, (1989)]. L'effet suppressif de K20 sur la prolifération cellulaire T permet d'envisager l'utilisation de cet anticorps dans la prévention des rejets de greffes.

La fixation de l'anticorps Hu-K20 produit conformément à l'invention, sur la molécule CD29 a été vérifiée par immunofluorescence. Les protocoles

expérimentaux suivis ont été précédemment décrits [GROUX et al. Nature 339, 152-154 (1989) ; TICCHIONI et al. Journal of Immunology 151, 119-127 (1993)].

Expériences d'immunofluorescence :

Des lymphocytes humains portant le récepteur CD29 ont été fixés sur lame de verre puis incubés en présence du Hu-K20 produit conformément à l'Invention, du K20 murin parental, ou du tampon seul.

Après une série de rinçages, on rajoute ou bien un anticorps secondaire fluorescent spécifique du Hu-K20 produit conformément à l'Invention, ou bien un anticorps secondaire fluorescent spécifique du K20 murin parental.

Après un nouveau rinçage, les préparations ont été observées au microscope pour visualiser la fluorescence. Ceci montre que le Hu-K20 produit conformément à l'Invention se fixe de manière spécifique sur les lymphocytes portant le CD29, tout comme le témoin positif K20 murin parental ; aucune fluorescence n'a été détectée en l'absence des anticorps K20, ou sur des cellules lymphocytaires B ne portant pas l'antigène CD29.

Exemple 7 - Comparaison de la spécificité du Hu-K20 produit par les cellules d'insectes , par rapport à celle du Mu-K20 initial:

MATERIEL et METHODES

Les lignées cellulaires utilisées sont:

- la lignée lymphocytaire T JURKAT clone E6-1 provenant de l'American Tissue Cell Collection (ATCC),
- la lignée HPB-All (don de C. ROZENFELD, Paris)
- la lignée B RAJI (lymphome de Burkitt) provenant de l'American Tissue Cell Collection (ATCC),
- la lignée B 88/66 (don de C. ROZENFELD, Paris)

Ces lignées sont cultivées en milieu RPMI 1640 (AXCELL, France) complémenté par 2 mM de L-glutamine

(TECHGEN, France), 1 mM de sodium pyruvate (TECHGEN), 50 mUI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine (TECHGEN), et 5% de sérum de veau foetal (GIBCO, Grande Bretagne) décomplémenté par 30 minutes de chauffage à 56°C. Les cellules sont maintenues dans un incubateur humidifié à 37°C et à 5% de CO₂.

2. Lymphocytes T du sang périphérique.

Les lymphocytes proviennent de donneurs volontaires sains (Centre de Transfusion sanguine ARNAUD TZANCK, Saint Laurent du Var). Les cellules mononucléées sont récupérées après centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque (EUROBIO, France). Les monocytes sont éliminés par deux cycles d'adhérence d'une heure sur plastique à 37°C. Parmi les cellules non-adhérentes ainsi obtenues, les monocytes résiduels, les cellules NK et les lymphocytes B sont éliminés par sélection immunomagnétique à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs de surface spécifiques de ces types cellulaires et de billes magnétiques recouvertes d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris (DYNABEADS, DYNAL, Norvège). La pureté lymphocytaire est contrôlée par vérification du phénotype.

3. Les thymocytes.

Ils sont obtenus à partir de thymus d'enfants (4 mois à 5 ans) subissant des interventions cardiologiques au Centre Cardio-thoracique de Monaco. Les érythrocytes résiduels sont éventuellement éliminés par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque.

4. Marquage immunofluorescent et cytométrie de flux.

Les cellules (1×10^6) sont lavées deux fois dans du PBS (NaCl 140 mM, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 6 mM, KH₂PO₄ 1mM, pH 7,4) 0,1% BSA (fraction V, BOEHRINGER), 0,1% NaN₃. Elles sont ensuite incubées avec un premier anticorps dans un volume final de 100 µl pendant 30 min. à 4°C. Après deux lavages, les cellules sont incubées de la même manière avec le deuxième anticorps, puis à

nouveau lavées deux fois. Les cellules sont ensuite fixées à la concentration finale de 1×10^6 , dans 500 μ l de PBS 1% formaldéhyde.

II. RESULTATS

1. Détermination des courbes dose-réponse en cytométrie de flux et distribution tissulaire.

Les cellules JURKAT E6-1, HPB-A11, RAJI, 88/66, des thymocytes et des lymphocytes T périphériques humains sont incubés avec des concentrations croissantes (0,01 à 30 μ g/ml) de chacun des deux anticorps K20 murin et humanisé. Après deux lavages, les cellules sont incubées avec du RAM-FITC (fluorescein conjugated F(ab')₂ fragment of rabbit immunoglobulin to mouse immunoglobulin (DAKOPATTS, Danemark) à la dilution de 1/100 ou du RAHu-FITC (Fluorescein conjugated rabbit immunoglobulin to human IgA, IgG, IgM, DAKOPATTS, Danemark) ou du GAHu-FITC (fluorescein conjugated F(ab')₂ fragment of goat immunoglobulin to human immunoglobulin (TEBU, France) dilués au 1/100.

Les résultats, qui sont illustrés par la Figure 4 (4A à 4G), sont les suivants :

Les deux anticorps Mu-K20 et Hu-K20 se fixent sur tous les types cellulaires testés avec une concentration saturante proche de 0,3 μ g/ml, excepté sur la lignée B 88/66 qui n'exprime pas la β 1-intégrine. Le marquage observé seulement dans le cas de l'anticorps K20 humanisé sur les cellules 88/66 est dû à la fixation de GAHu-FITC qui reconnaît les immunoglobulines de surface constitutivement présentes à la surface de ces cellules B. Cette fixation n'est pas observée dans le cas des cellules Raji, car celles-ci ont été présaturées avant le marquage par des immunoglobulines de lapin anti-immunoglobulines humaines.

2. Blocage de la fixation du K20 murin.

Les cellules JURKAT E6-1 sont incubées avec des concentrations croissantes, (de 0,01 à 30 μ g/ml),

d'anticorps K20 murin (Mu-K20) ou humanisé (Hu-K20), ou bien d'immunoglobulines humaines IgG1 (SIGMA, France). Après lavage, les cellules sont incubées avec une concentration saturante de K20-FITC (IMMUNOTECH, France) de 8 µl dans un volume final de 100 µl.

Les résultats sont illustrés par la Figure 5, qui montre que :

K20 humanisé reconnaît bien les mêmes épitopes que K20 murin puisqu'il bloque spécifiquement la fixation de K20 murin. Pour chacun des deux anticorps Mu-K20 et Hu-K20, lorsque les cellules sont incubées avec une concentration de 1 µg/ml, on constate qu'il n'y a plus de sites disponibles pour la fixation du K20 murin couplé au FITC. Ceci est en corrélation avec la valeur de la concentration saturante déterminée précédemment.

3. Déplacement du K20 murin.

Les cellules Jurkat E6-1 sont incubées avec une concentration saturante de K20-FITC (IMMUNOTECH, France) dans un volume final de 100 µl. Après lavage, les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes (0,01 à 30 µg/ml) de chacun des anticorps K20 murin (Mu-K20) ou humanisé (Hu-K20) ou d'immunoglobulines humaines IgG1 (SIGMA, France).

Les résultats sont illustrés par la Figure 6, qui montre que les anticorps monoclonaux K20 murin et humanisé déplacent la fixation du K20 murin couplé au FITC, ce qui n'est pas observé pour des immunoglobulines humaines de même sous-classe que l'anticorps humanisé. 50% du déplacement est atteint pour une concentration d'anticorps Mu-K20 ou Hu-K20 de l'ordre de 30 µg/ml.

4. Compétition des anticorps Mu-K20 et Hu-K20 avec l'anticorps Mu-K20 couplé au FITC.

Les cellules Jurkat E6-1 sont incubées avec 8 µl de K20-FITC à une concentration saturante (IMMUNOTECH, France), et des concentrations croissantes (0,01 à 30 µg/ml) des anticorps K20 murin ou humanisé

ainsi que des immunoglobulines humaines IgG1 (Sigma, France). Les résultats sont illustrés par la Figure 7, qui montre que les courbes de compétition observées pour chacun des anticorps sont superposables. La valeur de 50% de compétition est atteinte pour des concentrations d'anticorps comprises entre 0,3 et 1 µg/ml. L'anticorps IgG1 utilisé comme témoin n'exerce aucune compétition avec K20-FITC même à la plus forte concentration de 30 µg/ml.

Exemple 8 - Comparaison des activités biologiques du Mu-K20 et du Hu-K20:

1. Action sur la prolifération des lymphocytes T.

Les lymphocytes T du sang périphérique proviennent de donneurs volontaires sains (Centre de Transfusion sanguine ARNAUD TZANCK, Saint Laurent du Var). Les cellules mononucléées sont récupérées après centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque (EUROBIO, France). Les monocytes sont éliminés par deux cycles d'adhérence d'une heure sur plastique à 37°C. Parmi les cellules non-adhérentes ainsi obtenues, les monocytes résiduels, les cellules NK et les lymphocytes B sont éliminés par sélection immunomagnétique à l'aide de différents anticorps monoclonaux et de billes magnétiques recouvertes d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris (DYNABEADS, DYNAL, Norvège). La pureté lymphocytaire est contrôlée par phénotypage.

Un anticorps monoclonal CD3 (10 µg/ml) (X35, Dr MARTIN, Rennes) est immobilisé sur plastique dans des plaques 96 puits où sont cultivés les lymphocytes T à raison de 50000 cellules par puits dans un volume final de 200 µl de RPMI 1640, 10% SVF. L'interleukine 2 (10 ng/ml) (R AND D SYSTEM, GB) et différentes dilutions d'anticorps Mu-K20, Hu-K20 et d'Ig humaines contrôle sont rajoutés dans les puits. Au bout de 96 heures de culture à 37°C, 1 mCi de [³H] thymidine est ajoutée par puits.

Après 18 heures d'incubation , l'ADN cellulaire est piégé sur papier filtre grâce à un préleveur semi-automatique. L'incorporation est mesurée en coups par minute par comptage en scintillation liquide.

5 Les résultats sont illustrés par la Figure 8, qui montre que les deux anticorps Mu-K20 et Hu-K20 inhibent la prolifération des lymphocytes T à partir d'une concentration faible de 1 ng/ml. Pour des concentrations supérieures à 0,1 µg/ml qui est la
10 concentration saturante de l'anticorps, on constate que l'inhibition peut diminuer.

2. Mesure de l'adhésion à la fibronectine.

La fibronectine et de l'albumine bovine (50 µg/ml) (SIGMA) sont immobilisées dans des plaques à 96
15 puits, où sont incubées des cellules JURKAT préalablement chargées avec une sonde fluorescente, le BCECF (Boehringer), et marquées à l'aide des anticorps K20 (10 µg/ml) et de l'anticorps 4B4 (COULTER CLONE), qui est un anti-VLA4. Après incubation 2 heures à 37°C, les plaques
20 sont lavées 3 fois avec du PBS, et la fluorescence mesurée sur CITYFLUOR (MILLIPORE). L'adhésion spécifique est calculée en tenant compte du nombre de cellules déposées initialement dans le puits (150000) et de la fixation non spécifique sur l'albumine.

25 Les résultats sont illustrés par la Figure 9, qui montre que les deux anticorps Mu-K20 et Hu-K20 n'inhibent pas la fixation à la fibronectine, contrairement à l'anticorps 4B4.

La région des résidus 207 à 218 de la chaîne
30 β1 des intégrines est critique pour la liaison de l'anticorps 4B4; Cette région est localisée entre les deux sites putatifs de liaison des ligands (résidus 120-182 et 220-231). De son côté, l'anticorps K20 murin reconnaît la région carboxy-terminale de la β1 (résidus
35 426-587) (TAKADA et PUZON, 1993, J. Biol. Chem. 17597-17601).

3. Mesure de la cytotoxicité induite par le complément.

Après marquage par l'un ou l'autre des deux anticorps Mu-K20 ou Hu-K20, les cellules sont incubées avec du complément de lapin pendant 50 min. à température ambiante. Après lavage on détermine le rapport nombre de cellules mortes/nombre de cellules vivantes après coloration au Bleu Trypan. L'anticorps murin D66 (CD2) est utilisé comme contrôle positif.

Cette expérimentation, dont les résultats sont illustrés par la figure 10, montre que les anticorps Mu-K20 et Hu-K20 n'induisent pas la lyse des cellules en présence de complément.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
 - (B) RUE: 101, rue de Tolbiac
 - (C) VILLE: PARIS
 - (D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 75654 CEDEX 13
-
- (A) NOM: PROTEINE PERFORMANCE - SOCIETE ANONYME
 - (B) RUE: ROUTE D'ALES
 - (C) VILLE: SAINT CHRISTOL-LES-ALES
 - (D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 30380
-
- (A) NOM: MARGARITTE Christelle
 - (B) RUE: RESIDENCE COLBERT - BAT. E, 16, RUE DU GENERAL DE GAULLE
 - (C) VILLE: CHATENAY MALABRY
 - (D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 92290
-
- (A) NOM: POUL Marie-Alix
 - (B) RUE: 10, RUE DU DOCTEUR ROUX
 - (C) VILLE: MONTPELLIER
 - (D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 34000
-
- (A) NOM: LEFRANC Marie-Paule
 - (B) RUE: 4, RUE DU VALLON
 - (C) VILLE: CLAPIERS
 - (D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 34830
-
- (A) NOM: CERVONY MARY Florence
 - (B) RUE: 15, AVENUE ANTONIA AUGUSTA
 - (C) VILLE: NICE
 - (D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
 - (E) PAYS: FRANCE
 - (F) CODE POSTAL: 06000
-
- (A) NOM: BERNARD Alain
 - (B) RUE: -
 - (C) VILLE: -
 - (D) ETAT OU PROVINCE: -
 - (E) PAYS: -

(F) CODE POSTAL: -

(ii) TITRE DE L' INVENTION: OBTENTION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL RECOMBINANT HUMANISE A PARTIR D'UN ANTICORPS MONOCLONAL MURIN, SA PRODUCTION EN CELLULES D'INSECTE, ET SES UTILISATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 20

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGTAGATCTC AGCTTGGTCC C

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCA

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 34 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TGAGGAGACG GTGACCGTGG TCCCTTGGCC CCAG

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

AGGTSMARCT GCAGSAGTCW GG

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 325 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMBLACEMENT: 1..325

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GACATCCAGC TGACCCAGTC TCCATCCTCA CTGTCTGCAT CTCTGGGAGG CAAAGTCACC	60
ATCACTTGCA AGGCAAGCCA AGACATTAAC AAGTATATAG CTTGGTACCA ACACGAGCCT	120
GGAAAAGGTC CTAGGCTGCT CATACGTTAC ACATCAAAAC TAGAGTCAGG CATCCCATCA	180
AGGTTTCAGTG GAAGTGGGTC TGGGAGAGAT TATTCTTCA GCATCAGCAA CCTGGAGCCT	240
GAAGATATTG CAACTTATTA CTGTCTACAG TATTATAATC TTTGGACGTT CGGTGGAGGG	300
ACCAAGCTGG AGATCAAACG TAAGT	325

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 349 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMBLACEMENT: 1..349

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CAGGTCCAAC TGCAGGAGTC TGGGACTGAG CTCGTGAGGC CTGGGGCTTC AGTGAAGTTG	60
TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACTTTCCTACT GACTACTATA TAAGCTGGGT GAAACAGAGG	120
CCTGGACAGG GACTTGAGTG GATTGCAAGG ATTTATCCTG GAAGTGGTAA TACTTTCTAC	180
AATGAGAAAT TCAAGGGCAA GGCCACACTG ACTGCAGAAA CGTCCTCCAA CACTGCCTAC	240
ATGCAGCTCA GCAGCCTGAC ATCTGAGGAC TCTGCTGTCT ATTTCTGTGC AATTACTAC	300
GGTAGTGGTG ACTACTGGGG CCAAGGGACC ACGGTCACCG TCTCCTCAG	349

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 53 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CCATCACCTG GAAGGCAAGC CAGGACATTA ACAAGTATAT AGCTTGGTAC CAG	53
--	----

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 47 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CAAAGCTGAT CCGTTACACA TCAAACTAG AGTCAGGTGT GCCAAGC	47
--	----

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCTACTACTG CCTACAGTAT TATAATCTTT GGACGTTCCG CCAAG	45
---	----

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 41 paires de bases

38

- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GATACACCTT CACTGACTAC TATATAAGCT GGGTGCGCCA G

41

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 72 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

GAGTGGATGG GAAGGATTTA TCCTGGAAGT GGTAATACTT TCTACAATGA GAAATTCAAG

60

GGCAGAGTCA CC

72

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

TATTACTGTG CGATTTACTA CGGTAGTGGT GACTACTGGG GC

42

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

AGCTCGAGAT CAAACGG

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:
- GAAGATCTAA CACTCTCCGC GGTGGAAG 28
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:
- ACGTTTCTCG AGCYTGGTSC C 21
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:
- GACATCGAGC TCACCCAG 18
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:
- CAAGGTACCA CGGTCACCGT CTCC 24
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:
- GAAGATCTCA TTTACCCGGA GACAGGGAG 29
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

40

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 23 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AGGTSMARCT GCAGSAGTWC GGG

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 34 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

TGAGGAGACG GTGACCGTGG TACCTTGGCC CCAG

34

REVENDEICATIONS

1) Procédé d'humanisation de la région variable V_H et/ou de la région variable V_L d'une immunoglobuline non-humaine, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- une étape où l'on sélectionne une séquence d'ADN codant pour la région variable V_H ou pour la région variable V_L d'une immunoglobuline humaine, la séquence en acides aminés des régions FR de ladite région V_H ou de ladite région V_L humaine présentant respectivement entre 70 et 95 % d'homologie avec la séquence en acides aminés des régions FR de la région V_H ou de la région V_L de l'immunoglobuline non-humaine, et les boucles hypervariables H1 et H2 de ladite région V_H humaine ou les boucles hypervariables L1, L2 et L3 de ladite région V_L humaine présentant respectivement le même type de structure canonique que les boucles hypervariables H1 et H2 de la région V_H ou les boucles hypervariables L1, L2 et L3 de la région V_L de l'immunoglobuline non-humaine

- une étape où l'on procède au remplacement des séquences oligonucléotidiques codant pour les CDR de ladite région V_H ou V_L humaine, par les séquences oligonucléotidiques codant pour les CDR correspondantes de la région V_H ou V_L de l'immunoglobuline non-humaine.

2) Fragment d'ADN codant pour la région variable V_H ou pour la région variable V_L d'un anticorps humanisé Hu-Ac, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 1.

3) Fragment d'ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu à partir de l'anticorps murin K20, et code pour la région variable V_H ou pour la région variable V_L d'un anticorps humanisé dénommé Hu-K20.

4) Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment d'ADN selon une quelconque des revendications 2 ou 3, placé sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

5) Cassette d'expression selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle comprend les éléments permettant l'expression de la chaîne lourde ou de la chaîne légère d'un anticorps recombinant Hu-Ac, lesdits éléments étant constitués par :

10 - un promoteur de baculovirus, sous contrôle transcriptionnel duquel sont placés :

- une séquence codant pour un peptide signal de sécrétion ; et

15 - une séquence codant pour le domaine variable de la chaîne légère de l'anticorps Hu-Ac et une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne légère d'une immunoglobuline humaine ; ou bien

20 - une séquence codant pour le domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps Hu-Ac et une séquence codant pour le domaine constant de la chaîne lourde d'une immunoglobuline humaine.

6) Cassette d'expression selon une quelconque des revendications 4 ou 5, caractérisée en ce que le promoteur de baculovirus est le promoteur de la polyédrine ou l'un de ses dérivés, ou bien le promoteur de la p10 ou l'un de ses dérivés.

7) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'ADN selon une quelconque des revendications 2 ou 3.

30 8) Vecteur recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 4 à 6.

9) Vecteur recombinant selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il constitue un vecteur de transfert, portant un insert comprenant : une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 4 à 6, et de part et d'autre de cette cassette, des séquences de baculovirus homologues de celles des régions flanquant la portion du génome de baculovirus en remplacement de laquelle on souhaite insérer ladite cassette.

10) Vecteur de transfert selon la revendication 9, caractérisé en ce que lesdites séquences de baculovirus sont homologues de celles des régions flanquant le gène de la p10, ou homologues de celles des régions flanquant le gène de la polyédrine.

11) Vecteur de transfert selon la revendication 10, caractérisé en ce que la cassette d'expression contenant le gène codant pour la chaîne légère de l'anticorps Hu-Ac est flanquée des régions entourant le gène de la polyédrine dans le baculovirus sauvage, et la cassette d'expression portant le gène codant pour la chaîne lourde de l'anticorps Hu-Ac est flanquée des régions entourant le gène P10 dans le baculovirus sauvage.

12) Baculovirus recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 4 à 6.

13) Baculovirus recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression comprenant la séquence codant pour la chaîne H de l'anticorps Hu-Ac, et une cassette d'expression comprenant la séquence codant pour la chaîne L de l'anticorps Hu-Ac.

14) Baculovirus recombinant selon la revendication 13, caractérisé en ce que le promoteur contrôlant la transcription de la séquence codant pour la chaîne L de l'anticorps Hu-Ac, et le promoteur contrôlant

la transcription de la séquence codant pour la chaîne H de l'anticorps Hu-Ac, sont deux promoteurs différents.

15) Baculovirus recombinant selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'un desdits
5 promoteurs est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la polyédrine et l'autre est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la P10.

16) Baculovirus recombinant selon une
10 quelconque des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que la transcription de la séquence codant pour la chaîne légère de l'anticorps Hu-Ac est sous contrôle du promoteur de la polyédrine ou de l'un de ses dérivés, et la transcription de la séquence codant pour la chaîne
15 lourde de l'anticorps Hu-Ac est sous contrôle du promoteur de la P10 ou de l'un de ses dérivés.

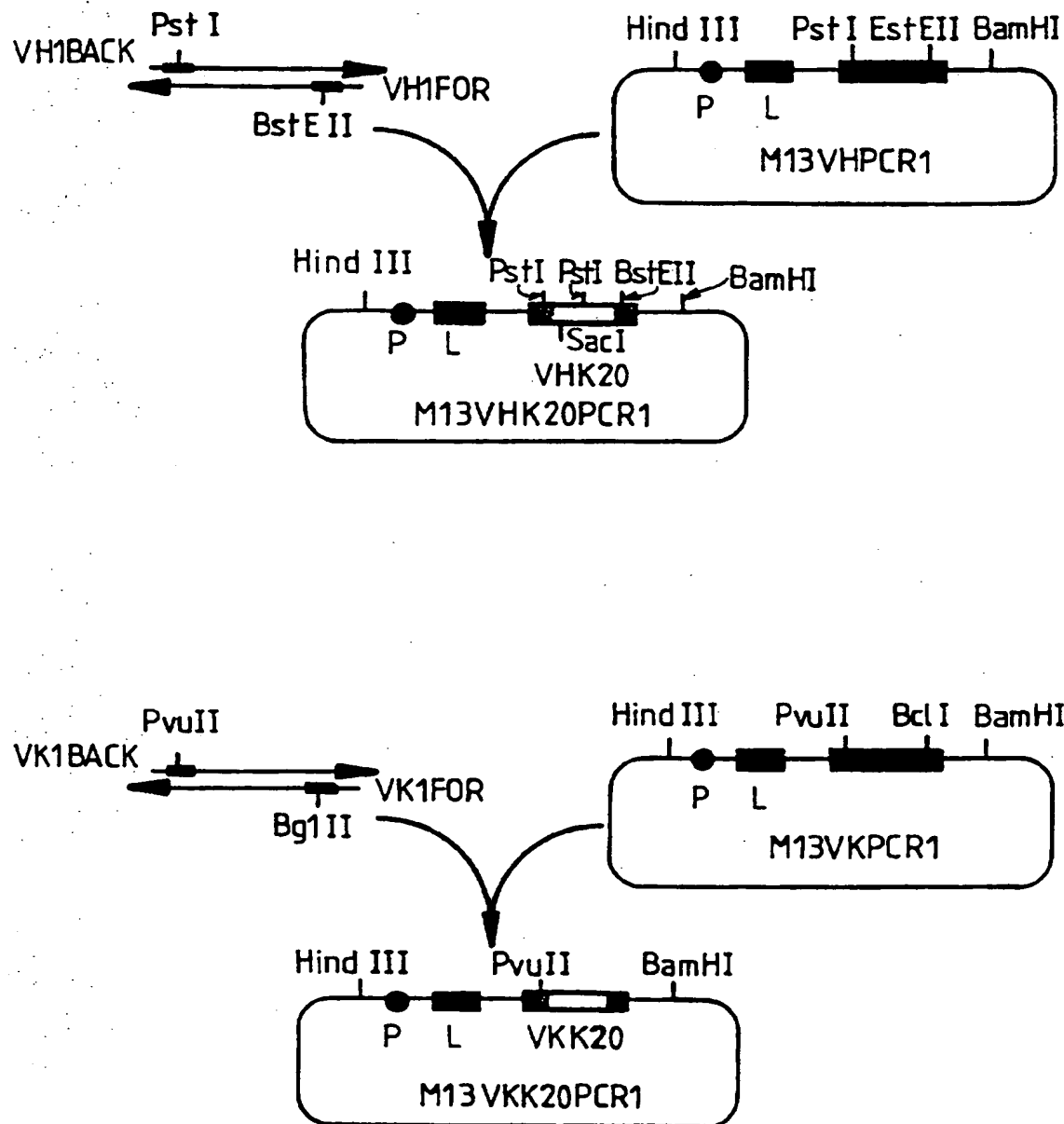
17) Baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que la séquence codant pour le peptide signal associé à
20 la chaîne L de l'anticorps Hu-Ac, et la séquence codant pour le peptide signal associé à la chaîne H de l'anticorps Hu-Ac, sont deux séquences différentes.

18) Baculovirus recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il s'agit du
25 baculovirus recombinant Ac10HK20hu-33LK20hu(111), déposé le 9 septembre 1994, auprès de la C.N.C.M., sous le numéro I-1476.

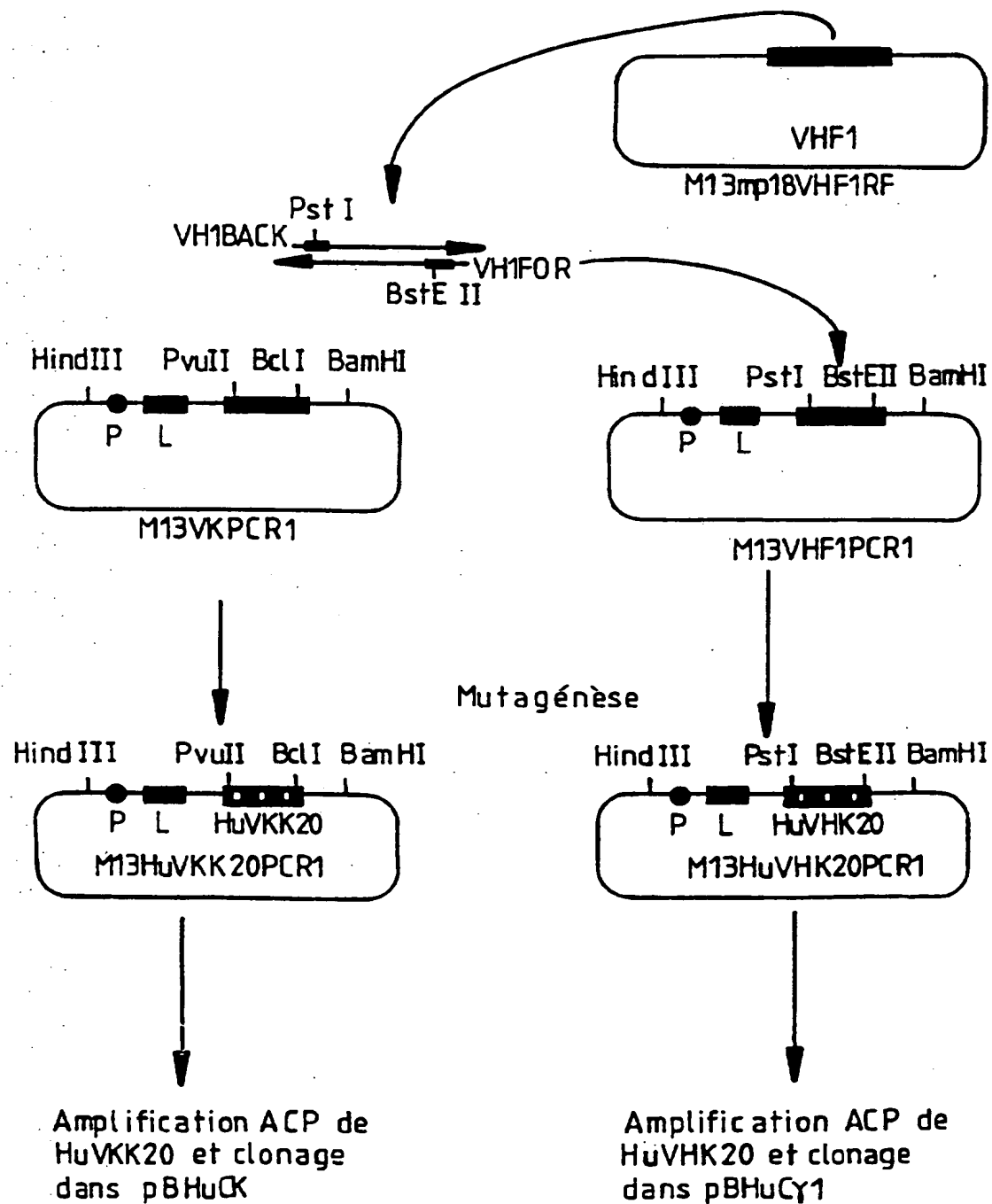
19) Cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant selon une quelconque des
30 revendications 12 à 18.

20) Procédé de préparation d'un anticorps recombinant humanisé, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle l'on cultive des cellules d'insecte selon la revendication 19, et une étape au
35 cours de laquelle l'on obtient ledit anticorps à partir du milieu de culture.

1/14

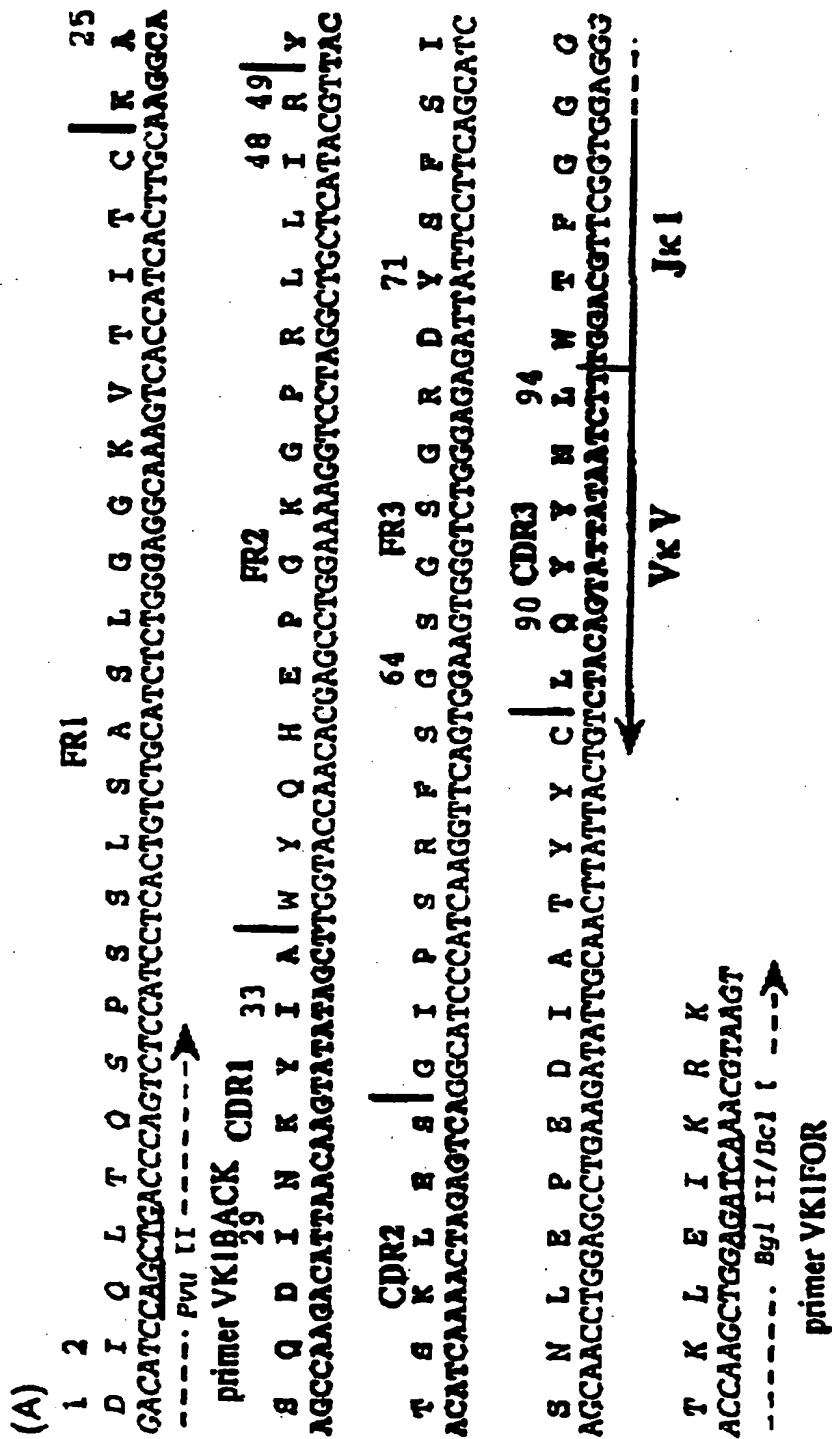
FIG.1A

2/14

FIG. 1B

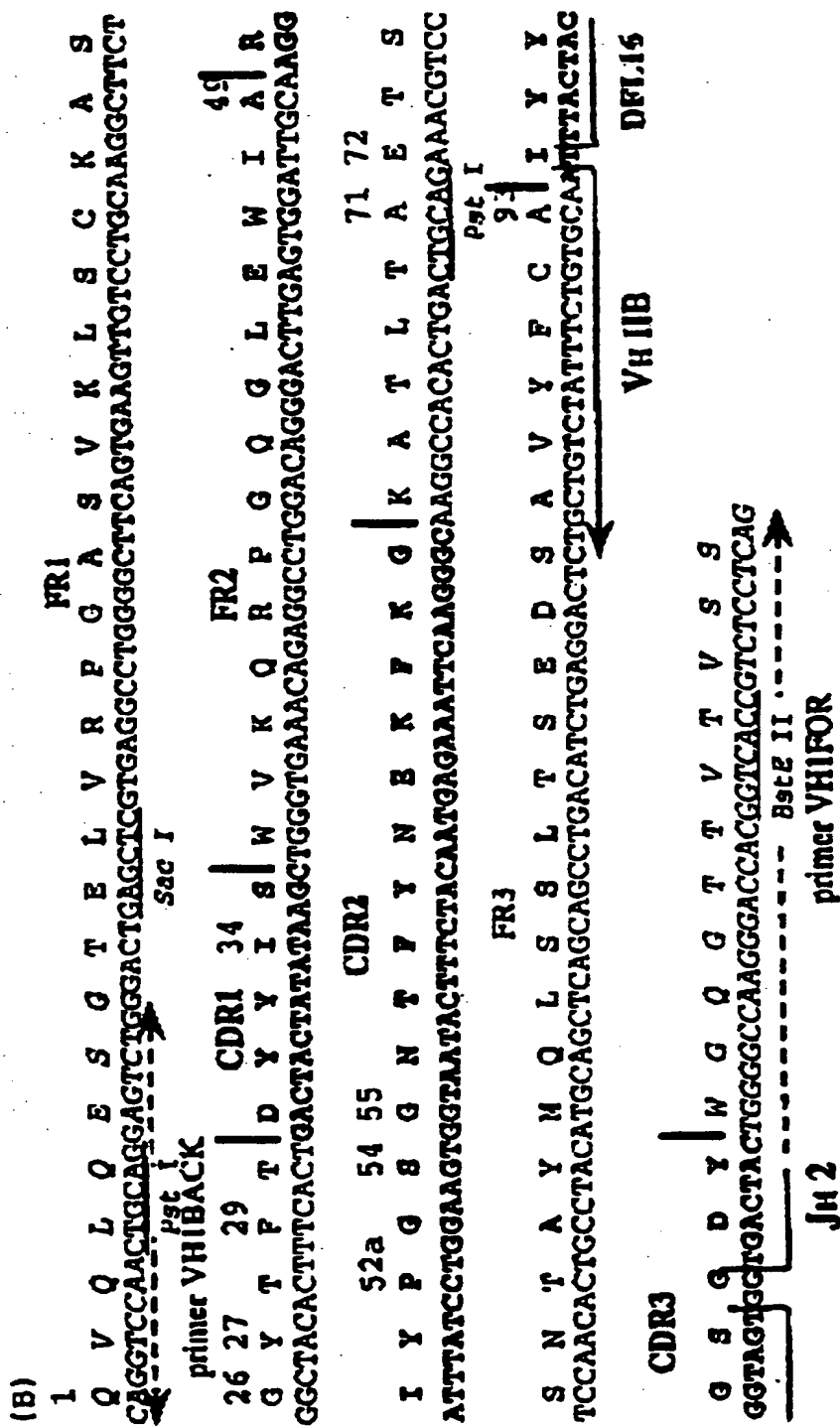
3/14

FIGURE 2A



4/14

FIGURE 2B



5/14

VKMUTCDR1
CCATCACCTGGAagGCaAGCcaggACA TtaACAAgTataTaGCTTGGTACCAG

VKMUTCDR2
CAAAGCTGATCcgTACACaTCAaaCTaGagtcaggGTGCGCCAAGC

VKMUTCDR3
CCTACTACTGCCctacagTatTatAatcct---tGGACGTTCGGCCAAG

VHMUTCDR1
GATACACCTTCACTgaCTActaTATaagcTGGGTGCGGCCAG

VHMUTCDR2
GAGTGGATGGGAaGGA TtaTccTGGaAg TGGTatATACttcTacaatgAGAAaTTCaAGGGCAGAGTCACC

VHMUTCDR3
TATTACTGTGCGa-----tttactacggtagtgTIGACTACTGGGGC

FIGURE 3

6/14

FIGURE 4A

Cellules JURKAT

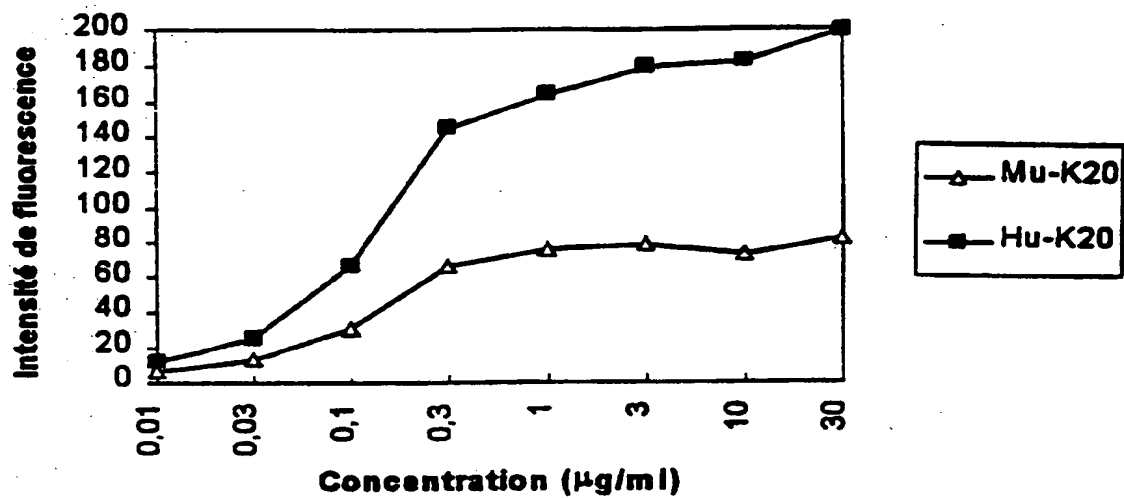
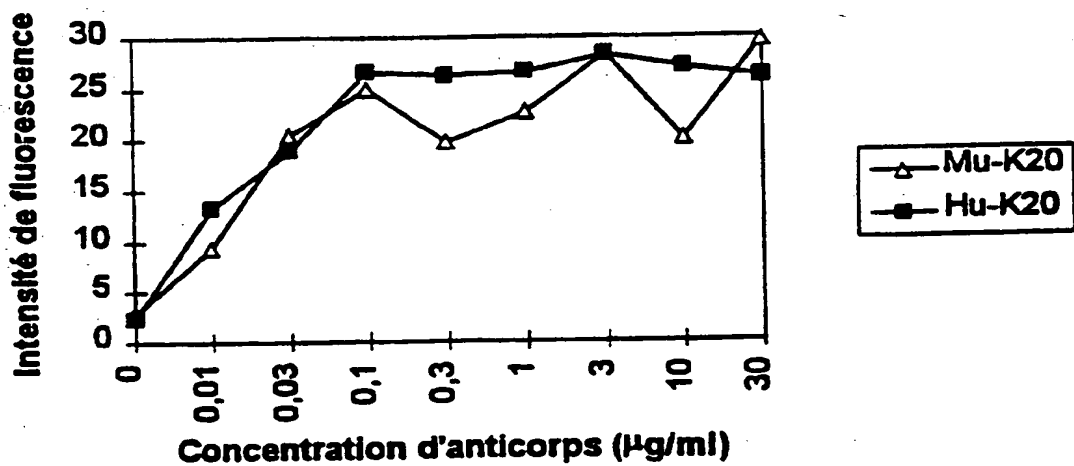


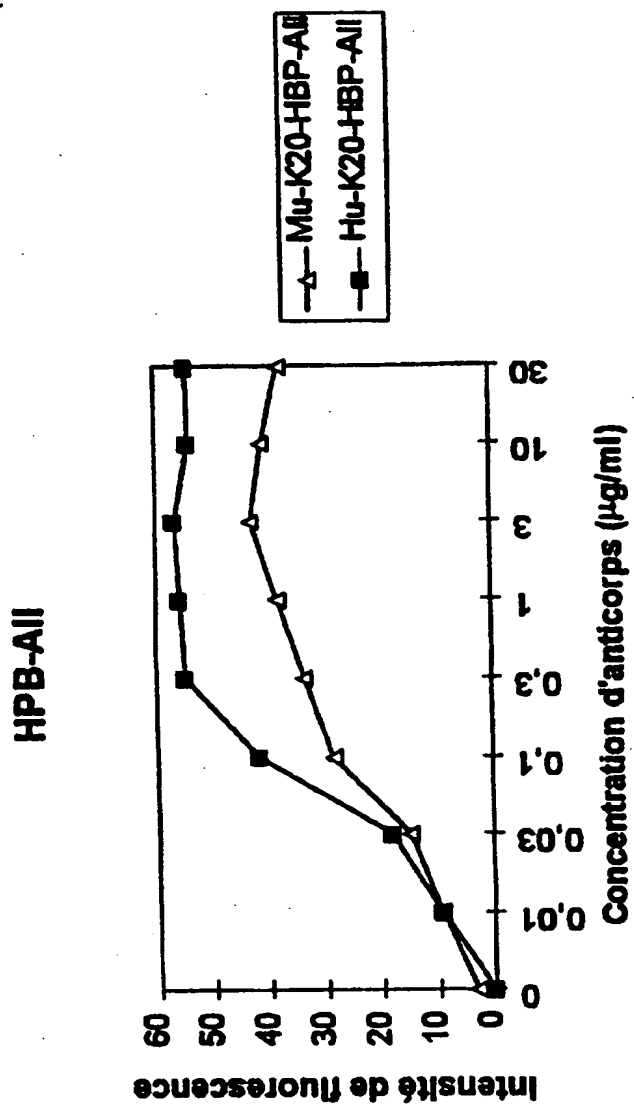
FIGURE 4B

Lymphocytes T

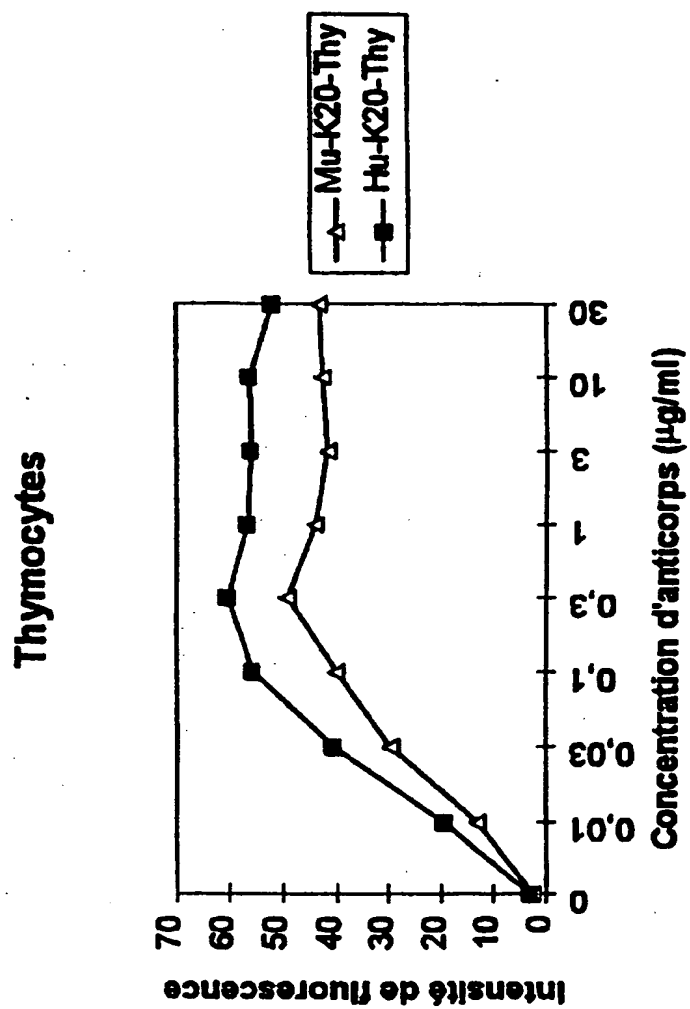


7/14

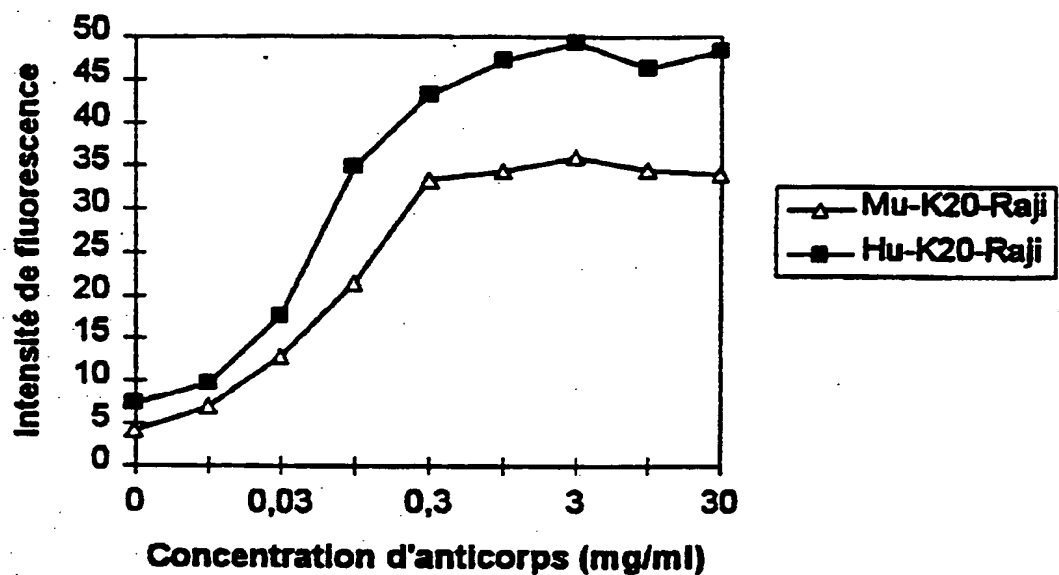
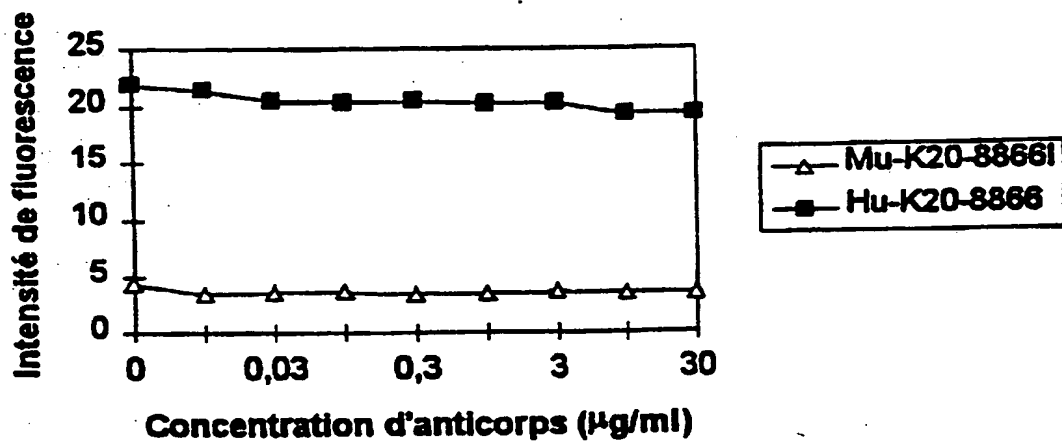
FIGURE 4C



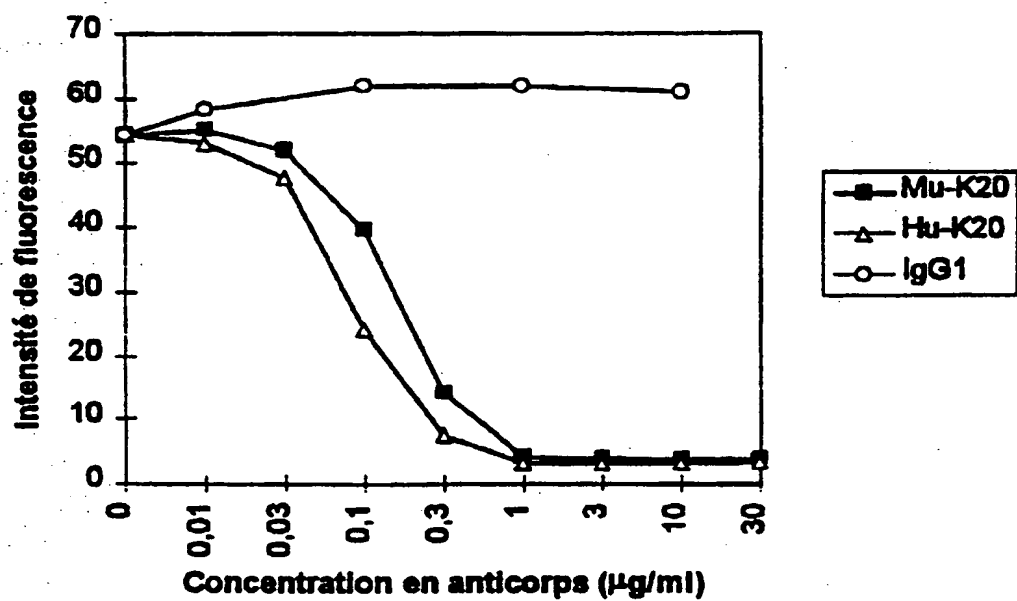
8/14

FIGURE 4D

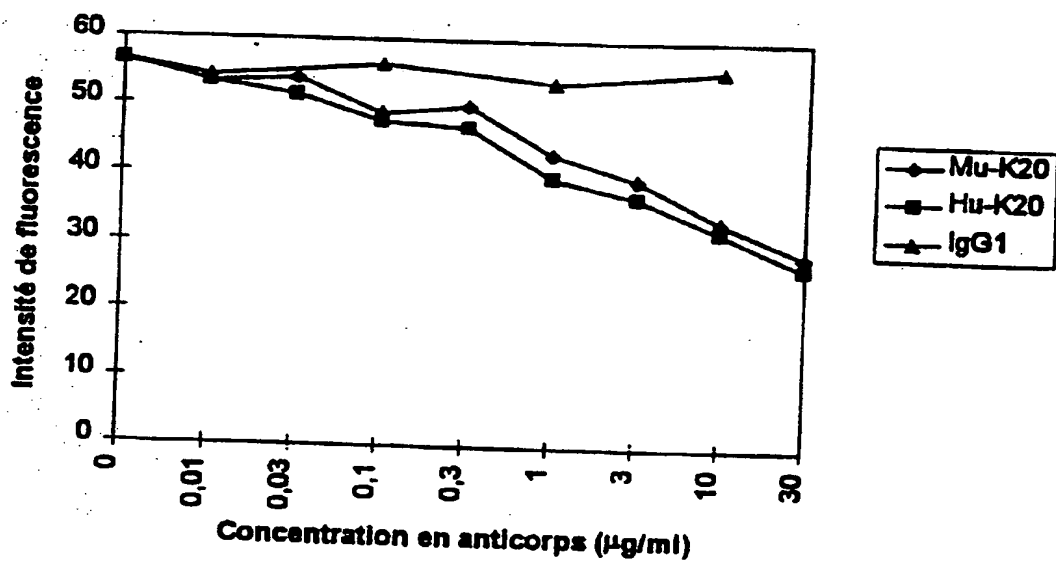
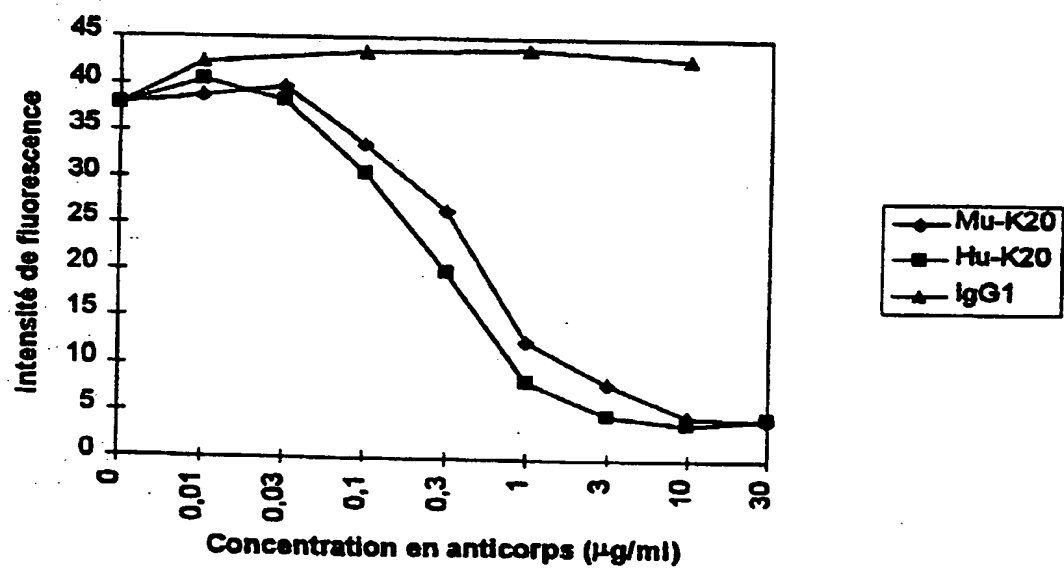
9/14

FIGURE 4E**Raji****FIGURE 4F****88/66**

10/14

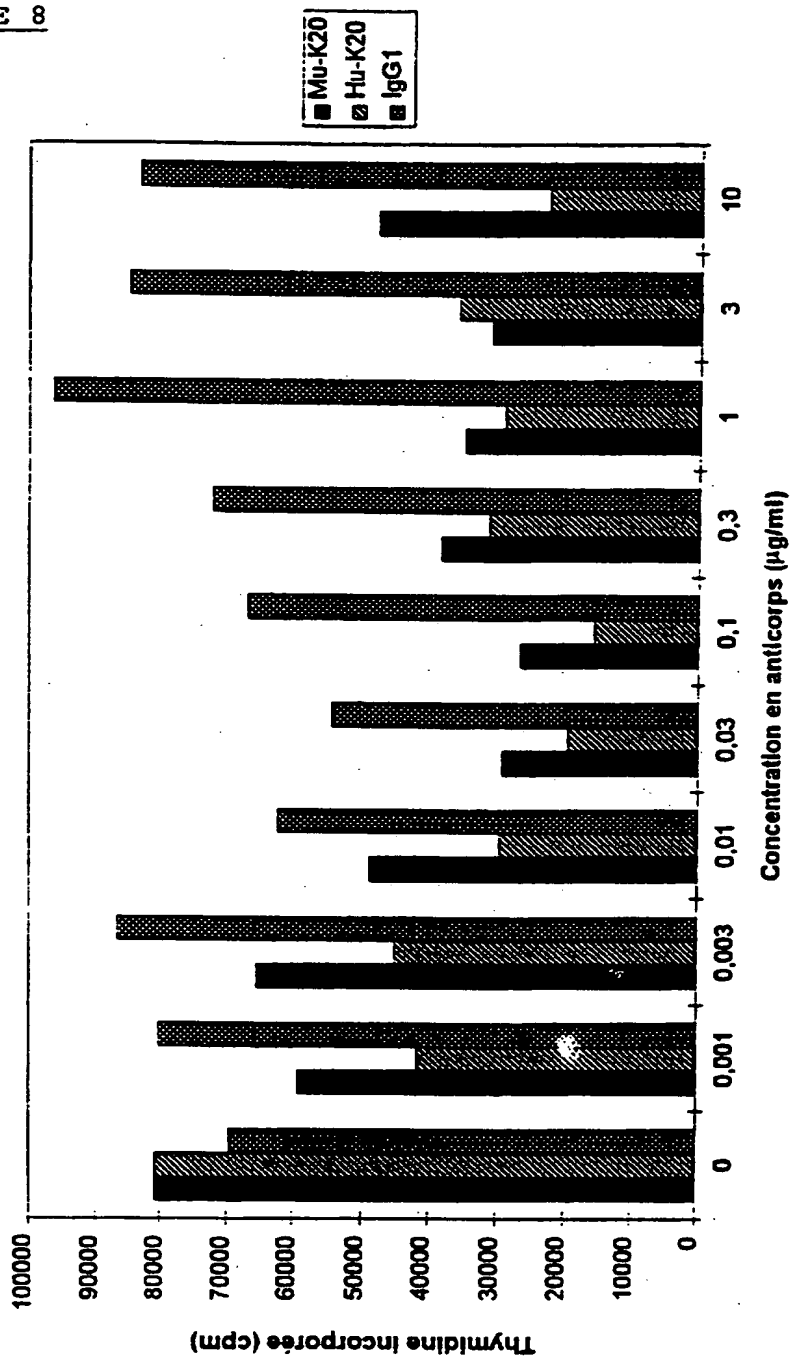
FIGURE 5

11/14

FIGURE 6FIGURE 7

12/14

FIGURE 8



13/14

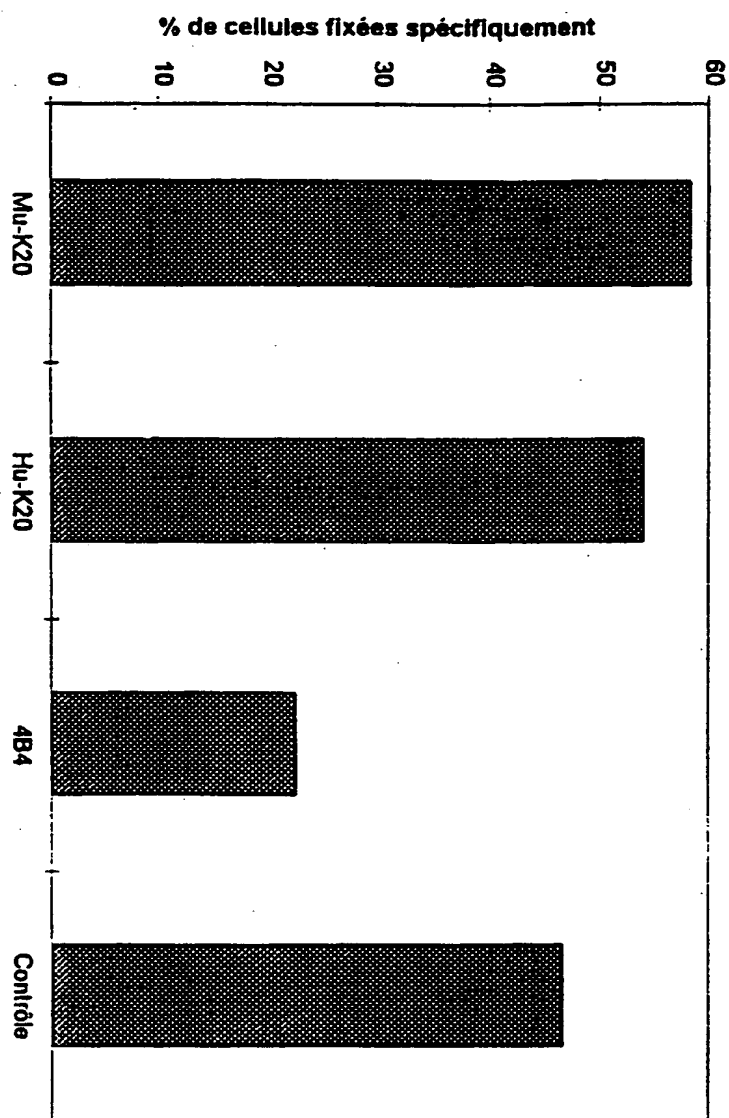
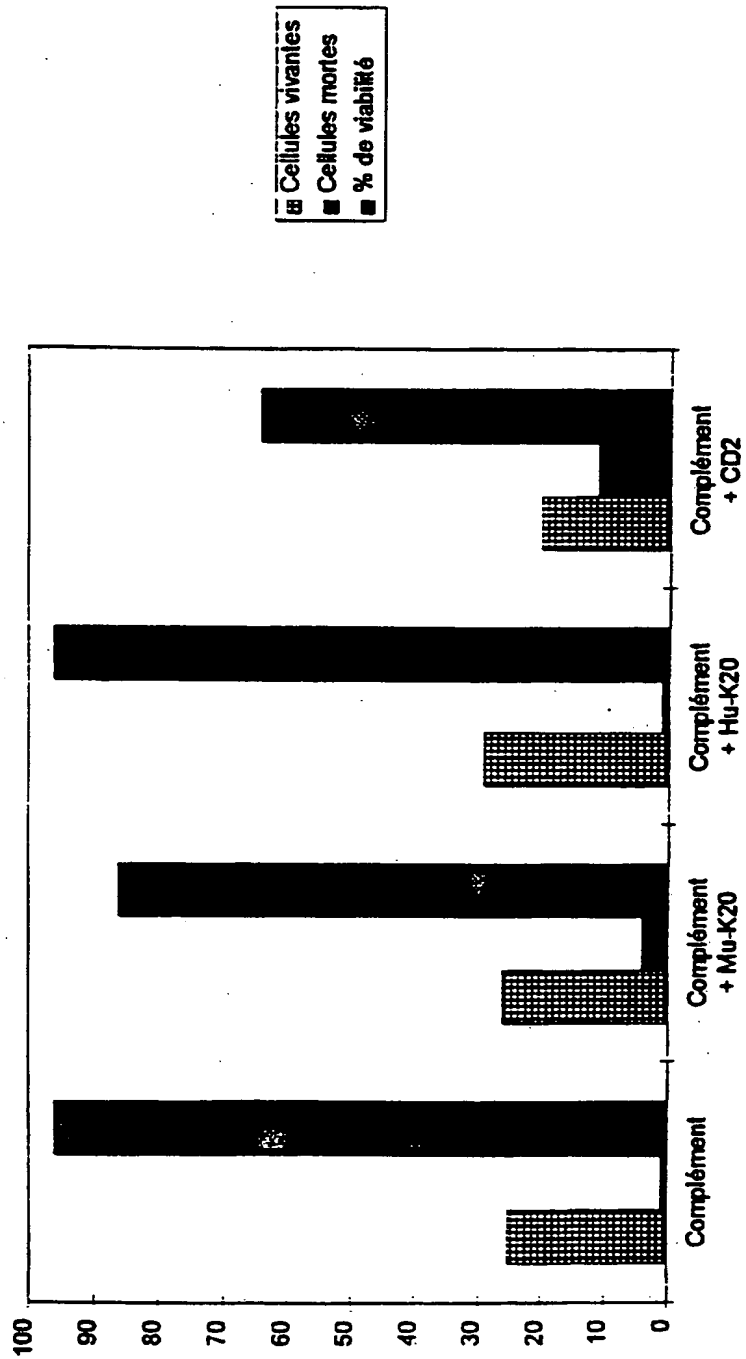


FIGURE 9

14/14

FIGURE 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/01167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/13 C07K16/28 C07K16/00 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 16094 (BIOGEN, INC.) 21 July 1994	1,2,4,7, 8
Y	see the whole document	3,5,6, 9-17, 19-23
Y	EP,A,0 345 152 (CNRS) 6 December 1989 see the whole document	5,6, 9-17,19, 20
Y	WO,A,94 00585 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL, INC.) 6 January 1994 see the whole document	5,6, 9-17,19, 20
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1995

Date of mailing of the international search report

05.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nauche, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/01167

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 1, 1 July 1993 pages 119-127, TICCHIONI M;AUSSEL C;BREITTMAYER JP;MANIE S;PELASSY C;BERNARD A; 'Suppressive effect of T cell proliferation via the CD29 molecule. The CD29 mAb 1 "K20" decreases diacylglycerol and phosphatidic acid levels in activated T cells.' see the whole document ---</p>	3,21-23
Y	<p>WO,A,91 03252 (WAYNER, ELISABETH) 21 March 1991 see claim 4 ---</p>	3
Y	<p>BIOFUTUR, 1993, 125, 3-15, MORELLE C see the whole document -----</p>	5,6, 9-17,19, 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01167

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9416094	21-07-94	AU-B- 5993694 EP-A- 0678122	15-08-94 25-10-95
EP-A-345152	06-12-89	FR-A- 2631974 AU-B- 626867 AU-B- 3529189 JP-A- 2035092 PT-B- 90687	01-12-89 13-08-92 07-12-89 05-02-90 31-10-94
WO-A-9400585	06-01-94	AU-B- 4553393 CA-A- 2138988 EP-A- 0647274	24-01-94 06-01-94 12-04-95
WO-A-9103252	21-03-91	AU-B- 654657 AU-B- 6354290 CA-A- 2065292 EP-A- 0489837 GR-B- 1001161 GR-B- 1001372 JP-T- 5503070	17-11-94 08-04-91 02-03-91 17-06-92 24-05-93 29-10-93 27-05-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des e internationale No

PCT/FR 95/01167

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,94 16094 (BIOGEN, INC.) 21 Juillet 1994	1,2,4,7,8
Y	voir le document en entier	3,5,6,9-17,19-23
Y	EP,A,0 345 152 (CNRS) 6 Décembre 1989	5,6,9-17,19,20
Y	WO,A,94 00585 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL, INC.) 6 Janvier 1994	5,6,9-17,19,20

X Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Décembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05.01.96

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nauche, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des e Internationale No
PCT/FR 95/01167

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 1, 1 Juillet 1993 pages 119-127, TICCHIONI M;AUSSEL C;BREITTMAYER JP;MANIE S;PELASSY C;BERNARD A; 'Suppressive effect of T cell proliferation via the CD29 molecule. The CD29 mAb 1 "K20" decreases diacylglycerol and phosphatidic acid levels in activated T cells.' voir le document en entier ---</p>	3,21-23
Y	<p>WO,A,91 03252 (WAYNER, ELISABETH) 21 Mars 1991 voir revendication 4 ---</p>	3
Y	<p>BIOFUTUR, 1993, 125, 3-15, MORELLE C voir le document en entier -----</p>	5,6, 9-17,19, 20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à : nombres de familles de brevets

De : le Internationale No

PCT/FR 95/01167

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9416094	21-07-94	AU-B- 5993694	15-08-94
		EP-A- 0678122	25-10-95
EP-A-345152	06-12-89	FR-A- 2631974	01-12-89
		AU-B- 626867	13-08-92
		AU-B- 3529189	07-12-89
		JP-A- 2035092	05-02-90
		PT-B- 90687	31-10-94
WO-A-9400585	06-01-94	AU-B- 4553393	24-01-94
		CA-A- 2138988	06-01-94
		EP-A- 0647274	12-04-95
WO-A-9103252	21-03-91	AU-B- 654657	17-11-94
		AU-B- 6354290	08-04-91
		CA-A- 2065292	02-03-91
		EP-A- 0489837	17-06-92
		GR-B- 1001161	24-05-93
		GR-B- 1001372	29-10-93
		JP-T- 5503070	27-05-93

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.